



TITLE:

ショウジョウバエのパターン形成
遺伝子twinsの分子遺伝学的研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

塩見, 健輔

CITATION:

塩見, 健輔. ショウジョウバエのパターン形成遺伝子twinsの分子遺伝学的研究. 京都大学, 1995, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1995-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3099634>

RIGHT:

②
学位申請論文

ショウジョウバエのパターン形成遺伝子
twins の分子遺伝学的研究

京都大学大学院理学研究科
生物物理学専攻

塩見健輔

目次

要旨

第1章	序論	1
第2章	成虫原基のパターン形成遺伝子 <i>tw</i> s	5
第1節	<i>tw</i> s ^P 変異株における成虫原基のパターン重複	
第2節	<i>tw</i> s 遺伝子のクローン化	
第3節	<i>tw</i> s 遺伝子の発現パターン	
第3章	<i>tw</i> s の末梢神経系の非対称分裂における機能	11
第1節	<i>tw</i> s の新しいアレルの分離	
第2節	末梢神経系の細胞運命の転換	
第3節	<i>tw</i> s 成虫致死変異の分子的基础	
第4節	他の神経系に及ぼす影響	
第5節	基質蛋白質同定の試み	
第6節	マウス <i>tw</i> s 相同分子のクローン化	
第4章	総合考察	21
第5章	研究に用いた材料と方法	26
	図、表	32
	参考文献	92
	謝辞	

要旨

多細胞生物の発生は、1つの受精卵の卵割を経て様々なタイプの細胞が誕生し、それらが秩序だった構造をつくりあげる過程である。個々の細胞は、自律的にあるいは環境と相互作用を行いながらその運命が決定され、特定のパターンを形成していく。本研究では、パターン形成に関与する新たな遺伝子の同定とその産物の機能の解明を目指して、ショウジョウバエを用いた分子遺伝学的アプローチを試みた。ショウジョウバエは、遺伝学的手法が可能であり、突然変異体を利用した方法で分子の生体内での機能の解明に有効な材料である。

成虫原基のパターン形成に異常を示す突然変異株の分離を出発点として、その中の1つの株 *twins* (*tw*s) の解析に焦点を絞った。最もシビアなアレルである *tw*s^P は転移因子 P エLEMENT の挿入変異であった。そのホモ接合体では成虫原基内に広範囲のパターン重複を起こしていることと、またその重複が鏡像対称であることを種々の分子マーカーを用いて示した。さらに *tw*s 遺伝子が 2A 型プロテインフォスファターゼ (Protein Phosphatase 2A, PP2A) の調節サブユニットをコードしていることを明らかにした。セリン/スレオニン残基の脱リン酸化をおこなうプロテインフォスファターゼは 2 価イオンに対する要求性の違い等で 4 つに分けられる。その中の 1 つである PP2A は、3 つのサブユニット (触媒サブユニット C と 調節サブユニット A と B) からなり、Tw_s 蛋白質は調節サブユニットの B である。

次にマイルドなアレル (partial loss-of-function mutation) である *tw*s^{SS} などを分離し、末梢神経系の機械刺激受容器官の構造異常を見出した。野生株の感覚器は、1つの母細胞の非対称分裂によって生まれる 4 つの異なるタイプの細胞で構成される。それらは 2 個の支持細胞、神経細胞、そして鞘細胞である。*tw*s^{SS} の感覚器では、支持細胞が 4 個に倍増し、同時に神経細胞と鞘細胞が欠失していた。この原因は、神経細胞と鞘細胞に分化すべき細胞が支持細胞に運命転換をおこしたと考えられる。

*tw*s 変異は、これらのような局所的なパターン形成異常を引き起こすが、PP2A のいずれのサブユニットも、特定の器官や細胞タイプによらず普遍的に存在した。従って *tw*s の表現型は、PP2A の基質の中に限られた細胞 (群) に発現している分子が存在することを示唆している。感覚器細胞の運命決定に関与することがわかっている既知の遺伝子産物に注目し、PP2A の標的分子である可能性を追及してみた。

酵母を用いた遺伝解析などから、細胞周期や細胞分裂などでの PP2A の役割が示されている。ショウジョウバエの *tw*s 変異株でも、細胞タイプによっては異常な細胞分裂像が見られ、分裂の速やかな進行に必要であることがわかった。本研究では B サブユニットの構造遺伝子の partial loss-of-function mutation を利用して、今まで知られていなかった細胞運命の決定における PP2A の役割を見出した。

第1章 序論

はじめに

多細胞生物の発生は、1つの受精卵から多様な細胞集団を生み出し、それらを規則正しく配列していく過程であると言える。このためには個々の細胞の運命決定が厳密にコントロールされ、秩序だって増殖や移動を行い、特定のパターンを形成していく必要がある。この発生過程の素過程は細胞の分裂である。様々なタイプの細胞集団を生み出すためには、同じ種類の細胞ばかりではなく、違う種類の娘細胞をつくる分裂が必要である。このように異なる運命へ進む娘細胞が生まれる分裂のことを非対称分裂と呼ぶ（Horvitz and Herskowitz, 1992; 図 1-1）。この娘細胞の運命決定機構として2つ考えられる。1つは内在性の細胞運命決定因子により自律的に行われる場合、もう1つは細胞間や環境との相互作用、具体的には誘導や抑制など外部からのシグナルにより細胞のタイプが決定される場合である（図 1-2）。本研究では分子遺伝学的アプローチの発達したショウジョウバエを材料に用い、パターン形成に参与する新たな遺伝子の同定とその産物の機能の解明を試みた。

ショウジョウバエを用いた研究

ショウジョウバエは、胚期、幼虫期、蛹期を経て成虫となる完全変態昆虫である（図 1-3）。ライフサイクルが短く突然変異が得やすいことから、古くから遺伝学が進んでいた。近年では突然変異体の分離を出発点として、様々な遺伝子が同定され、その遺伝子産物の生体内での機能解析が行われている。

改良されたPエレメントベクター挿入突然変異株を利用すると、挿入位置周辺のゲノムDNAを素早く分離できる（Cooley et al., 1988）。このため挿入により破壊された遺

伝子のクローン化が容易になった。またエンハンサー検出用のレポーター遺伝子が組み込まれており、遺伝子の発現パターンについての情報も得られる（エンハンサートラップ法）（O'Kane and Gehring, 1987）。このエンハンサートラップ法により特定の細胞でレポーター遺伝子を発現するようになった株は、マーカーとして利用することも可能である。

ショウジョウバエでのパターン形成に関する研究の主な系は、胚の体節形成と幼虫期の成虫原基形成である（Ingham, 1990）。胚の体節形成の研究では、体系的な突然変異体の分離を出発点として、前後軸や腹背軸の決定に関与する多数の遺伝子の機能が明らかになった（Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Ingham, 1988）。また、その分子機構は脊椎動物でも保存されていることが示唆されている。ホメオボックス遺伝子は、ショウジョウバエの胚の体節形成に関与する遺伝子として発見された。その脊椎動物の相同遺伝子も、脊椎動物胚での体節構造の誕生に必須な機能を果たすことが明らかになった（Reid, 1990）。このことは、系統上大きな隔たりがあり、体の構造も異なる昆虫と脊椎動物の間で、形態形成の原理が保存されていることを示している（Krumlauf, 1994）。

成虫原基は幼虫期に成長して、変態に伴い分化して成虫の体表構造を形成する上皮様組織である（Poodry and Schneiderman, 1970; 図 1-4）。その前駆細胞は胚発生期に誕生し、幼虫期に増殖する。3 齢幼虫では、一層の上皮細胞が特徴的なパターンで折り畳まれた構造をとっている。成虫原基のパターン形成は、次のような特徴を持つ。まず、成虫原基の特定の場所から発生する構造がわかっており、発生運命地図が確立している（Bryant, 1978; 図 1-5）。さらに成虫原基は、区画（コンパートメント）と呼ばれる、前側と後側、腹側と背側の細胞に区別できる。例えば、前と後ろのコンパートメントに属する細胞は、それぞれ増殖中に混ざり合わず、細胞の選別現象が起きている（Garcia-Bellido et al., 1973; Morata and Lawrence, 1977）。原基内の細胞はそれぞれの位置に特有の情報を持ち、細胞間相互作用を行いながら運命決定がなされて、パターンが形成されると考えられる（Whittle, 1990）。そこで本研究では P エlement ベクター（P-lacW）の挿入致死変異株のコレクション（Bier et al., 1989）を利用し、原基の形態に異常を生じる突然変異株を分離を出発点とした。

2A型プロテインフォスファターゼ (PP2A) の調節Bサブユニットの突然変異株 *tw*s

第3染色体の致死変異株ライブラリーの中で、まず蛹期に致死となる系統を選び出した。それらのうち成虫原基の形態異常を起こす株を4株分離した。このうちの1つの株 *lethal(3)11C8* では、成虫原基のパターン重複が起きているようであった。そこでこの遺伝子座を *twins (tw)*s と命名した。また復帰突然変異体の分離により、この株の表現型、致死性いずれも P エLEMENT の挿入が原因であると結論できた。そこで、この株を以後 *tw*s^P と呼び、この *tw*s 変異の表現型の解析と遺伝子のクローン化を行った。その結果 *tw*s 遺伝子は 2A 型プロテインフォスファターゼの調節サブユニットをコードしている事がわかった。

蛋白質のリン酸化、脱リン酸化は、その蛋白質の機能に密接に関連しており、様々な細胞内過程に影響を及ぼす。2A 型プロテインフォスファターゼは、リン酸化セリン/スレオニン (Ser/Thr) 残基の脱リン酸化を行う。リン酸化を行うプロテインキナーゼはその数が非常に多いが、Ser/Thr プロテインフォスファターゼは主として4つのグループ、1型、2A型、2B型、2C型に分けられる事が出来る (Cohen, 1989; Cohen et al., 1990; Peruski et al., 1993; 表 1-1)。それぞれ2価イオンに対する要求性や、阻害剤に対する反応性が異なっている。2A 型のプロテインフォスファターゼ (Protein phosphatase 2A, PP2A) は、3つのサブユニットからなる事が示されている。共通のコアサブユニットは、触媒サブユニットの C と調節サブユニットの A からなる。このコアに、もう1つの調節サブユニット B、B'、B'' などが結合し、様々な基質に対する PP2A の活性をコントロールしている (Usui et al., 1988; Kamibayashi et al., 1991; Agostini et al., 1992; 図 1-6)。

PP2A は *in vitro* において広い基質特異性を示し、生体内で様々な役割を果たしていると推測されている。酵母を利用した研究では、細胞周期の調節や細胞の形態形成における機能が示されている (Kinoshita et al., 1990; Healy et al., 1991; Ronne et al., 1991; Van Zyl et al., 1992; Kinoshita et al., 1993; Blacketer et al., 1993)。しかしながら、多細胞生物の発生における機能は示されていない。本研究では成虫原基形成が異常になる変異株 *tw*s を

用いてプロテインフォスファターゼのパターン形成における機能の解析を試みた。また *tws* のよりマイルドなアレル (partial loss-of-function mutation) では、成虫の機械刺激受容器官 (剛毛) で異常が観察された。機械刺激受容器官は細胞運命の決定機構を解析する良いモデル系である。調節サブユニットの欠失による 2A 型プロテインフォスファターゼの活性調節の攪乱が、機械刺激受容器官の細胞運命の決定にどのような影響を与えるかを検討し、フォスファターゼの発生における機能解析を試みた。

第2章 成虫原基のパターン形成遺伝子 *tws*

第1節 *tws^P* 変異株における成虫原基のパターン重複

蛹期致死変異株 *tws^P*

野生株のショウジョウバエは、25℃で孵化後3日目に3齢幼虫になる。さらにその4日後に幼虫は運動を停止し、収縮して前蛹となる。蛹期は4日間であるが、後期の蛹では、蛹クチクラの下に成虫クチクラや器官が出来上がっており、ファレート成虫と呼ばれる。蛹化後約4日間で羽化し、成虫となる。

第3染色体の蛹期致死変異株69系統の中から、成虫原基の形態に異常を示す株を4系統分離した。そのうち1株では、次に述べるように成虫原基のパターン重複が起きていることから、その遺伝子座を *twins* (*tws*) と命名した。また分離したアリルはPエレメントの挿入による変異であったので（後述）、このアリルを *twins^P* (*tws^P*) と呼ぶことにした。*tws^P* のホモ接合体は、ヘテロ接合体や野生株よりも約2日遅れて蛹になるが、ファレート成虫にまではならず死んでしまう。実体顕微鏡下の観察では、3齢幼虫の翅原基の形態が異常であった。以下に述べる *tws^P* 変異株の解析には、主に容器の壁を這い登ってくる3齢後期ホモ接合体の幼虫の組織を用いた。

分子マーカーを用いた成虫原基のパターン形成の検討

3齢幼虫の成虫原基は、一層の上皮細胞が特徴的なパターンで折り畳まれた構造をとっている。翅原基は、成虫の羽になる領域（Wing pouch）と、胸背板になる部分（Notum）に分けられ、特有の形態を示す（図2-1）。蛹期致死変異株 *tws^P* のホモ接合体の3齢幼虫後期の翅原基は、Wing pouch 様の構造が2ヶ所以上に認められた。この変異株 *tws^P* での翅原基の形態異常を、マーカーを用いて詳しい解析を行った。解析は、成虫原基の特定の領域の細胞で *lacZ* を発現しているエンハンサートラップシステムを利用する方法（表5-1）、もしくは、原基の特定のドメインに属する細胞を染色する抗体を用いる方法で行った。複数の分子マーカーの利用により、信頼性の高い結果を得られた。

翅原基におけるパターン重複

マーカーとして、*scabrous* 遺伝子座に *lacZ* が挿入された系統 ryXho38 を用いた結果を図 2-2 に示す。（以後このマーカーを *sca-lacZ* マーカーと呼ぶ。）この系統では、*lacZ* は成虫原基上の多数の細胞集団で発現される。これらの各集団から 1 つの感覚器母細胞（Sensory mother cell）が分化する（Mlodzik et al., 1990）。図のパネルに矢印で示す 2 列のシグナルは成虫の羽の前側の縁（Anterior wing margin、AWM）に相当する。

twsp 変異により、*sca-lacZ* マーカーの発現パターンは顕著に変化する（図 2-2（B））。成虫原基に、もうひとつ AWM に対応するパターンが出現した（図、矢印）。マーカーを用いずに観察できる形態的な特徴のみならず、この分子マーカーの利用により、*twsp* での異常は少なくとも Wing pouch の重複（Duplication）であると結論できた。余計にできる構造は常に後部区画（Posterior compartment）内に誕生する。Notum のシグナルの各々については、変異株の組織中で重複しているか否かを判断するのは困難である。

twsp の原基内での *engrailed* (*en*) の発現の解析結果も、パターンの重複を支持し、しかもそれが鏡像対称であることを強く示唆した（図 2-3）。抗 En 抗体は、野生株の成虫原基の後部区画の細胞核を染色し、後部区画の良いマーカーとなる（Brower, 1986; 図 2-3（A））。

twsp 変異株の原基の後部区画側の一部の領域では、En の発現が検出できなくなっていた（図 2-3（B））。形態から予想される 2 つの Wing pouch の間に対称軸を想定すると（白の破線）、この重複が鏡像対称であることがわかる。Duplication のみならず、頻度は低い Tripllication が観察されることもある（図、矢印）。

形態異常が著しくない場合でも、適当なマーカーを用いることによりパターン形成の欠損が検出可能であった。図 2-4 には、前後区画の境界で *lacZ* を発現するマーカー PA49 を用いた解析の結果を示す。かたちでは野生株と区別できない変異株の組織でも、PA49 マーカーの利用により、後部区画の一群の細胞が異所的な位置情報を獲得したことが確認できる（図 2-4（B）矢印）。大きな形態異常を示す原基では、後部区画に属するはずのより多数の細胞が *lacZ* を発現するようになる（図 2-4（C））。

パターン重複のモデル

tw^P では、翅原基の翅になる部分の重複形成が起きていることがわかった。この重複は鏡像対称であり、常に後部区画側に生じていた。

成虫原基の部分的なパターンの重複は、細胞死とそれに伴う再生によっても起きる事が知られている (James and Bryant, 1981)。 tw の翅原基の細胞死をアクリジンオレンジ等の色素を用いた生体染色で調べたが、顕著な細胞死は検出されなかった。また原基細胞の発生を胚に遡って観察した。胚発生期において翅原基の前駆細胞の数は約 20 個であるが、変異株でその数の減少や増加は見られなかった (データは示していない)。よって、細胞死によって重複が起きたり、前駆細胞が重複して誕生したりしているとは考えにくい。

そこで細胞運命の転換によりパターン重複が起きたと考えた (図 2-5)。形態に著しい異常がない場合でも、 tw^P では後部区画の一部の細胞が異所的な位置情報を獲得していた (図 2-4 (B))。その領域での細胞内の変化が形態異常に先立って起こったと考えられる。 tw 遺伝子の活性が損なわれたために、細胞運命の転換がおきて、その結果パターン重複を起こしていると考えられる。

翅原基以外の成虫原基についても異常の有無を検討した。野生株の平均棍原基は、翅原基と似た形態を示す。 tw^P の平均棍原基の形態も、翅原基のように異常になっており、パターン重複の発生が想像できる。肢原基は野生株の組織と比較して変形しているようだが、それがパターン重複のためであることを裏付ける結果は得られていない。眼・触覚原基はその組織全体の形態には異常は認められなかった。

第 2 節 tw 遺伝子のクローン化

復帰変異体の分離と解析

tw^P 株は、P エlement ベクター (P-lacW) がゲノムに 1 コピー挿入されたコレクション

ン (Bier et al., 1989) から分離された。この転移因子の挿入が成虫原基のパターン重複の原因であることを、復帰突然変異体の分離により証明しようと試みた (図 2-6)。P エLEMENTの挿入がある遺伝子を不活性化しているのなら、その P エLEMENTが染色体から正確に切り出されれば、野生型に回復し表現型が消失するはずである。ゲノム中の P-lacW がジャンプアウトした系統を分離し、成虫原基のパターンと致死性の有無を調べた。その結果、復帰変異株 (即ち正常なパターン形成を示し致死性の消失した株) が得られた。サザンブロット解析によるとこれらの系統の全てで、P-lacW が正確に切り出されていた。他方、P-lacW 内側の、一部の配列だけがゲノムから切り出され、依然として成虫原基のパターン重複を示す系統も得られた。

tw^s の転写単位の同定

P-lacW の挿入が成虫原基のパターン形成に重要な役割をする tw^s 遺伝子を不活性化していることが、復帰突然変異体の分離と解析から明らかになったので、tw^s の転写単位が挿入部位近傍にあることが予想される。そこで、P エLEMENT周辺のゲノム DNA を単離した後、P エLEMENT挿入部位近傍の転写単位を同定した (図 2-7)。ノザンブロットによる RNA の解析を行うと、野生株では、プローブ I では、3.0kb、4.0kb、4.6kb の 3 つのメッセンジャー RNA (mRNA) が検出される (図 2-7 (B))。tw^{sP} ホモ接合体 3 齢幼虫から抽出した poly A⁺ RNA 分画には、これら 3 つの mRNA は検出できなかったこと、また挿入部からより離れた位置の転写単位 (3.6kb、4.3kb と 1.9kb) は変化していないことから、プローブ I で検出された mRNA が tw^s の転写産物であると結論した。

tw^{sP} 株の P エLEMENTの挿入位置を決定するために、P エLEMENT内のプライマーを作製し、P エLEMENT周辺のゲノム DNA の塩基配列を決定した。その結果、tw^{sP} における P エLEMENTの挿入位置は、エクソン/イントロンの境界から 4 塩基対下流のイントロン内であることが判明した。

tw^s は 2A 型プロテインフォスファターゼの調節サブユニットをコードする

tw^s の cDNA をクローン化し、塩基配列を決定した結果、長いアミノ酸の読み取り枠が 1 つ存在した。その蛋白質は 443 アミノ酸で、分子量は 51kD と予想された (図 2-8)。

データベースの検索により、この蛋白質は 2A 型のプロテインフォスファターゼ (Protein phosphatase 2A, PP2A) の B サブユニット (55kD) と高い相同性があることが判明した。セリン/スレオニン残基特異的プロテインフォスファターゼは 2 価イオンに対する要求性や、阻害剤に対する反応性の違いにより、大きく 4 つのグループに分けられている。2A 型は阻害剤オカダ酸に最も感受性の高いフォスファターゼであり、金属イオン要求性はない。PP2A は主として 3 つのサブユニットからなる酵素である (図 2-9)。B サブユニットは調節サブユニットの 1 つで、A サブユニットとの結合を介して活性を調節すると考えられている (Cohen, 1989; Mumby and Walter, 1991)。ヒトには α と β の 2 つの B サブユニットが存在し (Mayer et al., 1991)、Tws 産物はヒト α とは 78 %、 β とは 75 % の類似性 (identity) を示している (図 2-10、図 3-28)。また、出芽酵母の B サブユニット相同遺伝子 *CDC55* も報告されており (Healy et al., 1991)、その産物とは 50 % の類似性を示す。ショウジョウバエに他の B サブユニット遺伝子が存在するかを、*tws* の cDNA をプローブに用い、緩い条件下でゲノムサザンプロット解析を行って検討したが、他のアイソフォームはないようであった (上村、未発表)。

ショウジョウバエの A サブユニットや C サブユニットはクローン化されており、それぞれ、脊椎動物と 75 %、95 % の類似性を示す (Orga et al., 1990; Mayer-Jaekel et al., 1992)。この A サブユニットと C サブユニット遺伝子の突然変異体は得られていない。

第 3 節 *tws* 遺伝子の発現パターン

Tws 蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析と染色により、発現パターンや細胞内局在を調べた。

発生段階を追ったウエスタンブロット解析を行った。野生株において、Tws 蛋白質は胚発生の初期から多量に存在する (図 2-11)。多量の mRNA が卵の中に存在する事が *in situ hybridization* により明らかになっており (上村未発表、Mayer-Jaekel et al., 1993)、この母親由来の mRNA から翻訳されたものであると考えられる。胚発生後期では細胞

分裂のさかんな神経系などに mRNA のより強い発現が認められるが、Tws 蛋白質のレベルはどの組織でも高く大きな差はなかった。これは母性 mRNA から作られた多量の蛋白質が、どの胚葉にも分配されたためと考えられる。蛋白の普遍的な存在様式は、A サブユニットや、C サブユニットについても同様である（データは示していない）。3 齢幼虫では、幼虫全体の抽出液中では検出が困難だが、成虫原基と中枢神経系、または唾線の分画に濃縮されていた。

Tws 蛋白質は細胞質に局在する事がわかった。図 2-12 (A) と (B) はステージ 6 の胚の共焦点レーザー顕微鏡による染色像である。細胞質にシグナルが認められる。成虫原基でも同様に細胞質での存在を検出できた（図 2-12 (C) ）。A サブユニット、C サブユニットの局在も検討したが、同様に細胞質に存在していた（データは示していない）。

第3章 *tw*s の末梢神経系の非対称分裂における機能

第1節 *tw*s の新しいアリの分離

突然変異株 *tw*s^P の P エlement を再びジャンプアウトさせて、復帰変異体を得る過程で、成虫で致死となる株を 22 系統分離した (図 2-6)。これらの成虫変異は、歩行不能など著しい運動失調を起こし、羽化後 2 日以内に死ぬことが判明した。体表の感覚器を調べたところ、機械刺激受容器官に異常が認められた。どの系統も *tw*s^P と、またお互いの間で致死性や表現型が相補されないことより、これらは *tw*s の新しいアリであると結論した。そこでこれらの株の代表的なものとして *tw*s⁵⁵ と *tw*s⁵⁹ を選び、解析に用いた。

いままでに得られている主なアリ、および欠失染色体との組合せた場合の表現型、そして致死となる時期を表 3-1 にまとめた。*aar*¹ は他のグループにより独立に分離された *tw*s のアリである。後述するように、細胞分裂が異常になる突然変異体のスクリーニングにより分離された (Gomes et al., 1993)。

第2節 末梢神経系の細胞運命の転換

末梢神経系の機械刺激受容器官 (mechanoreceptor)

成虫の体表には様々な感覚器が存在している。その主なものは機械刺激受容器官 (剛毛) である。成虫の胸部の背中側 (Notum) には、マクロキータと呼ばれる大きな剛毛と、マイクロキータと呼ばれる小さい剛毛とがある (図 3-1)。マクロキータはそれぞれ固有の場所に存在し、名称が付けられている。顕微鏡下で成虫の体表のクチクラを詳しく観察すると、剛毛はシャフトとソケットと呼ばれる構造から成り立っていることが

わかる。これらのシャフトとソケットの内側には、機械刺激を感知するための神経細胞（ニューロン）とそれを包み込む鞘細胞（グリア細胞）が存在する（図 3-2）。つまり剛毛は、シャフトとソケットを形成する支持細胞 2 個と、神経細胞そして鞘細胞の 4 つの細胞で構成される。これら 4 つの細胞は 1 つの感覚器母細胞から誕生する（Hartenstein and Posakony, 1989; Huang et al., 1991、図 3-3）。母細胞の分裂によってできる 2 つの 2 次前駆細胞、また 4 つの娘細胞は分化前には大きさ、形で区別できない（図 3-3）。だが生み出された細胞は異なるタイプに分化するので、これらの分裂は非対称な分裂であると言える。

tw⁵⁵ における剛毛の重複

tw⁵⁵ ホモ接合体の成虫の腹部の剛毛を観察した（図 3-4）。正常な器官ではソケットとシャフトが 1 対形成されるのに対して、変異株では、それらの構造が 2 組認められた（duplication or twin bristles）。また、ほとんどのソケットはお互いに近接して存在し、時には融合していた（図 3-4（B）、矢印）。*tw⁵⁵* 変異株の Notum では、マクロキータが形成される位置は変化しないが、剛毛が重複形成、もしくは 3 組形成（triplication）していた（図 3-5）。この重複は胸部、腹部だけでなく、羽の前側の縁、頭部、眼などの機械刺激受容器官でも生じた。このように *tw⁵⁵* 変異により支持細胞（つまりソケット細胞とシャフト細胞）の数が少なくとも倍増して 4 個、まれに 6 個誕生することが明らかになった。

tw⁵⁵ 変異のアリル、および *tw⁵⁵* 領域の欠失染色体を組合わせて、胸部のマクロキータの異常の頻度について統計をとった（図 3-6）。この結果、*tw⁵⁹* は *tw⁵⁵* に比べて、表現型がより弱い株であることが判明した。また、*tw⁵⁵* と欠失染色体を組合せて *tw⁵⁵* 活性をさらに減少させると（*tw⁵⁵/Df*）、1 本のシャフトに大きなソケットが付随しているマクロキータ（a single shaft with a large socket）の割合が上昇した。また *tw⁵⁵* ホモ接合体のマикроキータ（図 3-5、小さい矢印）の異常の頻度を調べた結果、約 15 % の剛毛で重複が起きていた。

剛毛重複のメカニズムの解析

*tw*s 成虫致死変異の感覚器を構成する細胞の存在を検討するために、蛹期の胸部を分子マーカーで染色して詳しい解析を行った。4つの細胞タイプを区別するために2つの分子マーカーを導入した。1つはモノクローナル抗体 22C10 である。この抗体を用いると、蛹化後 37 時間では、神経細胞とシャフト細胞の細胞質が染色される (Hartenstein and Posakony, 1989)。もう 1 つは Cut 蛋白質に対する抗体である (Blochliger et al., 1990, 1993)。機械刺激受容器官を構成する 4 つの細胞の全ての細胞核が、この抗体により染色される。この場合核の大きさ、相対的な位置や核内の染色パターンで、それぞれの細胞の区別が可能であった。

抗体 22C10 を用いると、野生株ではシャフト細胞と、軸索を伸ばしている神経細胞が染色される (図 3-7)。 *tw*s⁵⁵ 変異株の twin bristles の下では、2つのシャフト細胞のみが染色され、その周辺に神経細胞は存在していない (図 3-7 (B))。65 個の重複したマクロキーテのシャフトを調べた結果、64 個で神経細胞が観察されなかった。この神経細胞の欠損をマイクロキーテでも検討したが、やはり 84 個の重複形成された剛毛の何れにも神経細胞は付随していなかった。

Cut 蛋白質に対する抗体を用いた観察でも同様の結果が得られた。ソケット、シャフトを構成する支持細胞は、細胞分裂を伴わない DNA 複製を起こして、核のサイズがより大きくなる。野生株ではソケット細胞とシャフト細胞の大きい核が 2 つ、神経細胞と鞘細胞の小さい核が 2 つ観察される (図 3-8)。 *tw*s⁵⁵ では、シャフトが重複している場所には、大きい核のみが 4 つ染色され、かつ小さい核は周囲に存在していなかった (図 3-8 (C) と (D))。しかも核内の染色パターンを見るとシャフト細胞とソケット細胞が 2 対できており、剛毛の重複構造と一致していた。

以上の結果により、 *tw*s 成虫致死変異株では機械刺激受容器官の支持細胞が倍増し、その一方で神経細胞と鞘細胞が欠失する事が明らかになった。この表現型は、神経細胞と鞘細胞に分化すべき細胞が、支持細胞へと運命転換を起こしたと解釈すると容易に説明できる (図 3-10 (B))。

シャフト細胞からソケット細胞への運命転換

神経細胞と鞘細胞の支持細胞への運命転換に加えて、*twi*⁵⁵ と欠失染色体とを組み合わせた場合 (*twi*⁵⁵ / *Dr*) に、新たな異常を見出した。図 3-9 は感覚器を構成する 4 つの細胞全てを B52 マーカーで染色した結果である。*twi*⁵⁵ ホモ接合体では "double bristles" が主な表現型だが (図 3-9 (B))、*twi*⁵⁵ ヘミ接合体になるとソケット細胞 3 個とシャフト細胞 1 個という異常の頻度が増した (図 3-9 (C))。これはクチクラの観察で発見した "a single shaft with large socket" に対応すると考えられる (図 3-6)。つまり、遺伝子活性がさらに減少することにより、シャフト細胞からソケット細胞への運命転換が起きていた。このことはソケット細胞とシャフト細胞間の運命選択にも *twi* 遺伝子が機能していることを示唆している。

他のモデルの検証

twi 変異株で剛毛が重複するメカニズムは他にも 2 つ考えられる。まず第 1 に母細胞自身が倍增する可能性が挙げられる (図 3-10 (C))。しかし B52 マーカー (図 3-3) を用いて SOP の数を調べたが、*twi* 変異株で、余分な SOP が生まれていることを支持するデータは得られなかった。

次に細胞分裂の停止や、細胞死によって神経細胞と鞘細胞が欠損するモデルを検討した (図 3-10 (D))。野生株では Notum のマクロキテーの細胞は列ごとに同調して分裂を行う (Usui and Kimura, 1993)。このパターンが *twi*⁵⁵ で変化しているかを検討した。図 3-11 に示すように、変異株でも母細胞の同調した分裂が起きており、2 個の娘細胞 (2 次前駆細胞) ができていた。よって一部の SOP の最初の分裂が遅れたり、2 次前駆細胞の 1 つが細胞死を起こすことはないようである。ただしその後の 2 次前駆細胞の分裂パターンを、野生株と *twi*⁵⁵ で比較・検討することは困難であった。その理由は、野生株の 2 次前駆細胞 a cell と b cell が同調して分裂しないためである (Hartenstein and Posakony, 1989; Usui and Kimura, 1993)。核酸の類似分子であるプロモデオキシウリジン (BrdU) を細胞に取り込ませて、抗 BrdU 抗体による染色で細胞系譜を視覚化する方法も試みた。この方法では上皮細胞由来のシグナルも観察され、感覚器の細胞との区別が難しく、いずれかのモデルを特に支持するデータは得られなかった。また細胞死が起きているかどうかを色素による生体染色で検討したが、*twi*⁵⁵ の Notum で細胞死は検

出できなかった（データは示していない）。

FLP/FRT システムを用いたモザイク解析

*tw*s⁵⁵ などの成虫致死変異は一部分活性が残存している突然変異（partial loss-of-function mutation）である。*tw*s 遺伝子の活性がほとんどない場合、感覚器の表現型がどのようなかを検証するために、モザイク解析を試みた。モザイクを作製する方法としては FLP/FRT システムを利用した（図 3-12）。*tw*s 活性をほとんどもたない *tw*s⁶⁰ 変異を用いて、*tw*s となった感覚器の表現型を観察した。予備的な結果だが、シャフト、ソケットの重複が観察された（図 3-13）。ただし得られたクローンの数が少なく、またクローンのサイズも小さいので実験を重ねる必要がある。

第 3 節 *tw*s 成虫致死変異の分子的基础

ゲノム DNA 構造

22 株の成虫致死変異株は、*tw*s^P の P-*lacW* を再びジャンプアウトさせて得られたものである。つまり、P エlement が不正確に切り出されたと考えられる（図 2-6）。まず、サザンブロットを用いて調べてみたが、*tw*s⁵⁹ 株を除く他の株では、野生株のゲノム構造と区別がつかなかった。そこで P エlement 挿入部位の近傍のプライマーを作製し、PCR 法を用いてより詳しい解析を行った（図 3-14）。その結果 *tw*s⁵⁵ 株など 21 株では、20 から 40 塩基対の挿入が *tw*s 遺伝子のイントロン内にあることが判明した。PCR 産物の塩基配列を決定した結果、この挿入は P エlement の末端部分の残存によることがわかった。つまり P-*lacW* の両端の一部分がゲノム中に残される形で P エlement のジャンプアウトが起きていた。*tw*s⁵⁹ 株では、第 2 イントロンが 250 塩基対欠失し、かつ P-*lacW* 左端の 19 塩基対が残存していることが判明した。なおすべての復帰変異体では、P エlement は正確にジャンプアウトしていることが判明した。

RNA スプライシングの部分的な阻害

野生株では、*tw*s 遺伝子からは、3.0kb、4.0kb、4.6kbの3つのメッセンジャー RNA (mRNA) が転写される (図 3-15)。成虫致死変異株の *tw*s^{ss} と *tw*s^{sp} 株ではプローブ I で、3 本の高分子量の RNA が検出された。これらはイントロン特異的なプローブ II でも検出できることより、mRNA の前駆体であることが判明した (図 3-15 (B)、プローブ II)。つまり P エlement 由来の断片がエクソン/イントロン境界に挿入しているために、RNA のスプライシングが部分的に阻害されているらしい。

2A 型プロテインフォスファターゼを構成する C サブユニットと A サブユニット遺伝子のプローブでは、野生株と *tw*s 変異株でそれらのメッセージの量には変化はなかった。

B サブユニット量の低下

2A 型プロテインフォスファターゼを構成する各サブユニットに対する抗体を作製し、野生株及び *tw*s ホモ接合体の 3 齢幼虫から抽出した蛋白質を用いてウエスタンブロットを行った (図 3-16)。Tws 蛋白質に対する抗体を用いると、野生株では 51kD のバンドが検出できる。*tw*s^P ではそのバンドがほぼ消失している。さらに *tw*s^{ss} 変異体中の B サブユニットの蛋白量は、野生株に比べて 2 % 程度にまで減少している事を確認した。*tw*s^{sp} では 10% 程度残存していた。触媒サブユニット C ともうひとつの調節サブユニット A の蛋白量は野生株と変化しておらず、B サブユニットの量のみが減少していた。

第 4 節 他の神経系に及ぼす影響

化学刺激受容器官 (chemoreceptor)

機械刺激受容器官のほかの感覚器として、化学刺激受容器官や複眼がある。*tw*s 変異がこれらの感覚器の形成に影響を与えるかどうかを検討した。

1 つの神経細胞が支配する機械刺激受容器官と異なり、化学刺激受容器官は 5 つの神経細胞に支配されている。1 つの chemoreceptor を構成する細胞のうち、少なくともいく

つかは同じ母細胞由来である (Hartenstein and Posakony, 1989; Ray et al., 1993)。

羽の前側には機械刺激受容器官と、その後ろの列に化学刺激受容器官が存在する (図 3-17)。 *tw^s* の羽の機械刺激受容器官は重複を起こす。だがこの部分の化学刺激受容器官は重複などを起こしてはいなかった (図 3-17 (B))。口器の化学刺激受容器官では重複がまれに観察された。また羽の後側の細長い毛は、神経の支配を受けてはおらず、感覚器ではない。だが、これらの構造も *tw^s* 株では重複を起こしていた (図 3-17 (D))。

複眼の光受容細胞の一部欠失

ショウジョウバエの複眼は幼虫の複眼原基からできる感覚器である。複眼形成には様々な細胞間相互作用が必要であり、リン酸化によるシグナル伝達機構が良く調べられている (O'Neill et al., 1994)。個眼 (ommatidium) と呼ばれる複眼の構成単位は、20 個の細胞から出来ており、そのうち 8 つが光を受容する光受容細胞 (R1-R8) である。 *tw^s* 変異が複眼形成時のシグナル伝達機構に与える影響を、3 齢幼虫の複眼原基と成虫の複眼を調べて検討した。

方法としては、光受容細胞の R7 になる細胞のマーカーである XA12 を用いて変異株での複眼のパターンを調べた。その結果個眼の配列や R7 の数には著しい異常は観察されなかった (図 3-18 (A) と (B))。

tw^s の成虫の複眼にわずかながら rough eye の表現型が観察された。個眼を構成する細胞の数に変動がある時に、rough eye になることが知られている。そこで電子顕微鏡を用いた解析を行った。その結果 R1 から R7 までの光受容細胞の数が 8 % の個眼で 1 つずつ減っていた。その異常のほとんどは、R1 から R6 までのいずれかの細胞の欠失であった (図 3-18 (C))。

中枢神経系の構造

次に *tw^s* 変異株の中枢神経系においても、末梢のような細胞タイプの運命転換が起きていないか、またシグナル伝達機構に異常がないかを検討した。まず *tw^s* 株の 3 齢幼虫の中枢神経系の全体的な構造を観察した。野生株では視覚処理領域 (視葉、optic lobe)

の三日月状の軸索束や、胸部の3対の神経節の形成が観察できる（図 3-19（A））。しかし *twsp* ホモ接合体では、いずれの形成も不完全であった（図 3-19（B））。成虫の脳での異常も検討したところ、*twss* では視葉の層構造が形成されず、また脳のサイズも野生株より小さかった（図 3-20）。

twsp のアリの 1 つである *aar¹* は中枢神経系の神経母細胞（neuroblast）の細胞分裂が阻害される事が明らかになっている（Gomes et al., 1993）。本研究で分離したアリにおいても細胞分裂の表現型が検出できるかを3齢幼虫で調べた。その結果、*aar¹* で報告されたのと同様な分裂像の異常が観察できた（図 3-21）。神経節等の形成不全は、神経母細胞の分裂が阻害されておきたと考えられる。

中枢神経系の視覚処理領域は、3齢幼虫期に形成され、optic lobe と呼ばれる。複眼原基の光受容細胞の軸索（R-axon）が optic lobe 内へ伸長してくると、ラミナ前駆細胞は G1 期から S 期へ移行し、分裂の後ラミナニューロンへと分化する（図 3-22）。この S 期への移行は、R-axon とラミナ前駆細胞の接触が引き金になり、何等かのシグナルが伝達されて起こると推測されている（Selleck and Steller, 1991; Selleck et al., 1992）。

twsp 変異がこのプロセスに影響を与えているかを知る目的で、光受容細胞の軸索の投射パターン、ラミナ前駆細胞の細胞周期の進行が正常に起きているか調べた。複眼原基の光受容細胞から伸びる軸索は optic lobe で半月状に広がる（図 3-23（A）と（B））。ところが *twsp* ではこの投射パターンが乱れて、きれいに広がっていなかった（図 3-23（C））。

プロモデオキシウリジン（BrdU）を用いて細胞分裂を行っている領域を視覚化すると、*twsp* では全体的に BrdU でラベルされる細胞の数は減少しているものの、光受容細胞の神経終末に BrdU のシグナルは観察された（図 3-24（B））。よって前駆細胞の細胞周期が完全に停止しているわけではなかった。ラミナ前駆細胞だけでなく、脳内の細胞増殖領域でも BrdU⁺ の細胞数が減少していることは、*twsp* 変異が細胞分裂そのものをブロックしていることと一致する。従って中枢神経系での構造異常の多くが、分裂装置の欠損という内在性の原因により生じたことが予想され、外界からのシグナルの伝達機構が機能しているかどうかの検討は困難である。

第5節 基質蛋白質同定の試み

末梢神経系の細胞運命を決定する他の遺伝子の1つ、*numb*

*tw*s 遺伝子の関与する運命決定機構に、他にどのような分子が機能しているかを明らかにすることを目指して標的遺伝子の探索を試みた。*Tw*s 蛋白質は 2A 型プロテインフォスファターゼの調節サブユニットであるので、変異株中では基質蛋白質の脱リン酸化の状態に変化があると考えられる。そこで変異株中でリン酸化の状態が変化している分子を同定すれば、その蛋白質は基質である可能性が高い。しかしながらプロテインフォスファターゼはリン酸化酵素に比較して基質特異性が低いとされており、生化学的に細胞運命の決定に関与する基質蛋白質を探索していく方法は難しいと思われる。

ショウジョウバエの利点を生かして、基質蛋白質を遺伝学的に探索することも可能だと考えた。*tw*s 変異と似たような表現型を示す既知の突然変異が存在すれば、同じ運命決定機構の異常であることが期待できるかもしれない。*numb* 遺伝子の機能喪失変異 (loss-of-function mutation) では、*tw*s^{ss} と同様に神経細胞が欠失して剛毛が重複する (Uemura et al., 1989; 図 3-25)。現在のところ *tw*s^{ss} の表現型と酷似しているのは、*numb* の機能喪失変異しか報告がない。また Numb 蛋白質は、感覚器母細胞が分裂する時に、娘細胞に不均等に分配される細胞質決定因子 (cytoplasmic determinant) であることが示されている (Rhyu et al., 1994; 図 3-26)。さらに Numb 蛋白質がリン酸化されていることがわかっている (Rhyu、私信)。そこで *numb* と *tw*s の間に機能上の連関がないかを検討した。

まず抗 Numb 抗体を用いて蛹期の Notum を染色し、*tw*s^{ss} で Numb の分配が正常かどうかを検討した。しかしながら、我々の手では野生株でも図 3-26 のような偏って存在するシグナルを得る事が難しい事が判明した (図 3-27)。次にウエスタンブロット法で Numb 蛋白質のリン酸化が *tw*s 変異により影響を受けていないかを調べた。3 齢幼虫から抽出した蛋白質を用いて、ウエスタンブロットを何回か繰り返し行った。野生株の試料中にはリン酸化型と非修飾型と思われる複数の Numb のバンドを確認できたが、変異株中で、Numb のリン酸化に再現性のある変化を見出すことは出来なかった (データは示していない)。

第6節 マウス *tws* 相同分子のクローン化

脊椎動物の神経系はより多種多様な細胞により形成されている。より複雑な脊椎動物の神経系において、PP2A が細胞の発生運命決定に関与しているかを追求する第一歩として、マウスの B サブユニットのクローニングを PCR 法で試みた。ヒトやラットの哺乳類では、現在までに B サブユニット遺伝子は、 α と β の 2 種類存在することが報告されており、このうち β は、神経系特異的に発現するといわれている (Mayer et al., 1991; Hatano et al., 1993)。鋳型としてマウスの新生児の脳及び成体の脳の cDNA を使い、プライマーは種間で保存されている領域を用いた (図 3-28)。PCR により得られた DNA 断片をクローン化して、塩基配列を部分決定した。その結果 α と β の DNA 断片は、プライマー #12 と #16 を用いた時に増幅された。次にこの得られた cDNA 断片をプローブにして成体の脳の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。 α 、 β とも複数のクローンが得られた (図 3-29)。得られたクローンの塩基配列を決定して、予想されるアミノ酸配列をヒトの B サブユニットと比較したところ、ほぼ配列は一致していた。

第4章 総合考察

プロテインフォスファターゼの役割

蛋白質のリン酸化と脱リン酸化は、翻訳後修飾の代表的なもので、蛋白質の機能へ様々な影響を及ぼす。リン酸化による蛋白質の活性化あるいは不活性化は、細胞の情報伝達機構の重要なメカニズムの1つである。プロテインフォスファターゼは、プロテインキナーゼに比較して広い基質特異性を持ち、生体内でも幅広い役割を持つと考えられている。ショウジョウバエのプロテインフォスファターゼについては *retinal degeneration C* (*rdg C*) と *corkscrew* (*csw*) の産物が、突然変異体を用いた解析から形態形成や組織の維持に必須であることが示されている。*Rdg C* は、Ser/Thr プロテインフォスファターゼの触媒サブユニットと約 30% の類似性を持ち、その変異体は光刺激により光受容細胞が死ぬ (Steele et al., 1992)。*Csw* は非レセプター型のリン酸化チロシン残基の脱リン酸化酵素であり、胚の末端の運命決定に関与している (Perkins et al., 1992)。またショウジョウバエの1型の Ser/Thr フォスファターゼのひとつについては、有糸分裂の進行に欠かせないことが証明されている (Axton et al., 1990)。

多細胞性物の2A型プロテインフォスファターゼ (PP2A) の機能については、これまで主に生化学的な解析がなされてきた。脊椎動物のPP2Aは、*in vitro* では様々な蛋白質の脱リン酸化をおこなうことから、*in vivo* では多面的な機能を持つことが予想されている。例えば、解糖系などの酵素の活性を調節したり、*cdc2* キナーゼの活性化を制御することなどが挙げられている (Lee et al., 1991; Clarke et al., 1993)。また酵母の突然変異株を用いた機能解析もなされてきた。分裂酵母のPP2Aの触媒サブユニットの突然変異株では、有糸分裂の異常が見られた (Kinoshita et al., 1990; Kinoshita et al., 1993)。出芽酵母でBサブユニットの突然変異株 *cdc55* が分離され、その完全欠失変異 (null mutation) は細胞増殖が低温感受性となり、制限温度下では隔壁形成や細胞質分離などに異常を生じる (Healy et al., 1991)。しかしながら、多細胞生物でのPP2Aの機能を、突然変異体の分離から追究した仕事は本研究以前にはなかった。

本研究では、ショウジョウバエのパターン形成を遺伝学的なアプローチで解析していくプロセスで、新しい遺伝子 *twins* (*tw*s) を同定でき、*tw*s が PP2A の B サブユニットをコードしていることを示した。*tw*s 変異株でも細胞のタイプによっては細胞分裂が阻害されており、細胞周期での機能が明らかとなった（後述）。しかしながら、partial loss-of-function mutation の分離により、いままで知られていなかったパターン形成や細胞運命決定における PP2A の活性調節の重要性を示し、PP2A の生体内での役割についての研究に新たな局面を開くことができた。B サブユニットは A サブユニットと共同して C サブユニットの基質特異性を調節している。*tw*s 変異体中には A サブユニットと C サブユニットは存在しているので、B サブユニットによる活性調節が重要であることを示している。in vitro での実験から、用いる基質によっては変異体中の PP2A 活性の低下を検出できた（図 4-1）。B サブユニットを含めた PP2A の各サブユニットは、蛋白質レベルでは、発生の特定の時期や組織に発現しているわけではなく普遍的に存在する。しかしながら B サブユニットの量の減少は、極めて限られたパターン重複や運命転換を引き起こす。この表現型は基質となる蛋白質が、時期あるいは空間特異的に発現もしくは活性化されていると考えると説明できる。

成虫原基のパターン形成

*tw*s 変異株では成虫原基、特に翅原基のパターン重複がおきるが、それはどのようなメカニズムによるものであろうか。成虫原基で最もよく知られているパターン重複は、細胞死とそれに引き続いておきる再生過程でのパターン重複がある（French et al., 1976; Bryant et al., 1981）。50 % 以上の成虫原基細胞が取り除かれるか、細胞死を起こすと、残りの細胞からの再生過程でパターン重複が起きることが予測されている。しかしながら、*tw*s の成虫原基で極端な細胞死は検出されていない。他の可能性は、細胞運命の転換による重複である。例として、*engrailed*¹ 変異が挙げられる（Lawrence and Moraa, 1976）。後部区画に属するはずの細胞が、前部区画の細胞のような形態分化をとげた結

果、翅のパターンが重複する。また、細胞間相互作用がもたらす非自律的な重複の例もある。*wingless* や *armadillo* 等の変異体である (Sharma and Chopra, 1976; Peifer et al., 1991)。それらの遺伝子が欠損すると翅が欠失し、胸背板が重複形成される。

twi^P は鏡像対称のパターン重複を翅原基に引き起こす。ホモ接合体の翅原基は、余分な翅の部分の後部区画に生じる。この新たに生じた翅それ自体が、前部区画と後部区画の両方を持つ。つまりほとんど完全なパターンの重複が1つの翅原基内で起きており、これは過去に報告されたことのない広範囲のパターン重複である。

成虫原基のパターン形成時において、前後区画、あるいは腹背区画の境界における区画間の相互作用が重要であると示唆されている。例えば分泌蛋白質である Hedgehog は Engrailed の調節のもとに、後部区画で発現して、後部区画から前部区画の細胞へのシグナルとして働くと考えられている (Tabata and Kornberg, 1994; Basler and Struhl, 1994)。形態異常がそれほど顕著でない *twi* の成虫原基でも、後部区画に属する一部の細胞で前後軸境界のマーカーの異所的な発現が観察された。比較的初期にこの部分で運命転換が起こり区画の境界部分が誕生すれば、その後の細胞間相互作用により翅のパターンが重複するのではないかと考えられる (図 4-2)。本研究では細胞増殖がほぼ終了した3齢幼虫後期での成虫原基のパターン解析を中心に行った。より早いステージでのパターンを検討することは、組織が小さいだけに技術的な習熟が必要だが、今後の課題としなければならない。

末梢神経系の運命決定

成虫原基での解析に比べ、末梢神経系での解析は単一細胞レベルで行うことが出来た。機械刺激受容器官は細胞系譜が判明しており、非対称分裂という観点から細胞運命の決定機構を解析する良いモデル系である (Jan and Jan, 1993; Posakony, 1994)。

twi 変異では、機械刺激受容器官の神経細胞と鞘細胞が、ソケット細胞とシャフト細胞へと運命転換を起こす。B サブユニットによる PP2A の活性調節がこの運命決定に必

須である事が示された。この運命決定を細胞分裂の観点から考えれば、*tw*s の表現型は感覚器母細胞の非対称分裂が、対称になってしまったと考えられる（図 4-3）。正常な器官の母細胞は分裂時に異なる運命へと向かう娘細胞（a cell と b cell）を生み出すが、*tw*s では 2 個の娘細胞が同じ細胞タイプに分化してしまう。またアリの組み合わせによっては、シャフト細胞からソケット細胞への運命転換も観察できた。このことは *Tw*s 蛋白質が 2 次前駆細胞の分裂時にも機能している事を示している。

この研究では母細胞の非対称分裂において、*tw*s がどの細胞で機能を果たすか、言い換えれば蛋白質脱リン酸化が絡む運命決定のメカニズムを明らかにすることはできなかった。可能性のひとつとして、母細胞から娘細胞の片方に運命決定因子が分配される際に、*tw*s が必要となることを推測し、その仮説の検証を試みた。母細胞の非対称分裂では、遺伝子 *numb* の産物が細胞質決定因子の役割を果たすことが示されている（Rhyu et al., 1994）。*Numb* は母細胞の分裂の際に、2 個の娘細胞（a cell と b cell）のいずれか一方に偏って伝達されるが、この因子が欠けると *tw*s 変異株とよく似た運命転換が起きる。不均等な *Numb* の分配が *tw*s⁵⁵ で影響を受けていないかを検討したが、残念ながら明確な結論を得ることはできなかった。また *Numb* 自身のリン酸化が *tw*s 変異株中で変化していないかを検討したが、SDS-PAGE でのバンドシフトで調べる限り、野生株と比べ再現性のある差を検出できなかった。

非対称分裂のメカニズムとして、内在性因子に加え、外来性の要因も重要である。誕生した娘細胞間での相互作用により、お互いの運命を牽制しあって、その結果異なるタイプの細胞への分化をたどる。実際に機械刺激受容器官の運命決定にも、この細胞間相互作用が関っている事が示されている（図 4-4）。細胞間相互作用を担っていると考えられる膜蛋白質である Notch や Delta を、母細胞の分裂後に失活させると娘細胞はすべて神経細胞になってしまう（Hatenstein and Posakony, 1990）。*tw*s が a cell と b cell の間の情報伝達に参与する可能性も否定できない。例えば母細胞の娘細胞は 2 つとも a cell になる能力を持っているが、正常の感覚器の発生では一方の娘細胞（a cell）からその姉妹細胞（b cell）に向かって、a cell への分化を抑制するシグナルが発信されているかもしれない。*tw*s 変異株では、この抑制シグナルを受け取っても、細胞内の情報伝達系に破綻を起こしているためにその情報を解読できず、a タイプの細胞が 2 個誕生すること

が想像できる。

細胞分裂の異常

我々とは独立に、B サブユニットの変異体のアリル *aar*^l が分離された (Mayer-Jackel et al., 1993; Gomes et al., 1993)。*aar*^l 変異株の幼虫の中枢神経系では、神経母細胞 (neuroblast) の細胞分裂の進行が阻害される。分裂後期において、染色体の過凝縮などの異常が観察される。我々の単離した *tw*s のアリルにおいても、神経母細胞で同様の異常な分裂像を確認できた。しかし中枢神経系とは異なり、*tw*s⁵⁵ では末梢の感覚器母細胞 (SOP) の分裂がブロックされる証拠は得られなかったばかりか、余分な分裂が起きたためと推測できる剛毛の triplication まで観察された。細胞分裂のパターンは、neuroblast と SOP とでは異なっている (図 4-5)。neuroblast はより小さな娘細胞を繰り返し生み出す幹細胞であるが、SOP とその娘細胞は大きさと形で区別が付けられない (Hartenstein and Posakony, 1989)。また、neuroblast は SOP より数倍大きな細胞である。細胞分裂に要求される Tw

s 蛋白質の量が、神経母細胞と他の細胞では異なっていると考えられる。
*tw*s^P ホモ接合体でも成虫原基の成長が阻害されている様子はない。ただ *tw*s^P ヘミ変異体 (*tw*s^P / *Df*) になると成虫原基の形成不全が観察される (図 4-6) ので、*tw*s^P からはわずかながら活性のある B サブユニットがつくられるようである。*tw*s 遺伝子座の complete loss-of-function mutation が分離できれば、中枢神経系だけでなく多くの器官で細胞分裂が停止することが予想される。*tw*s^P ホモ接合の遺伝子型では、原基の細胞増殖に必要な、最低限度の量の B サブユニットができるが、そのレベルはパターン形成には不十分である。成虫原基のパターン形成は同じ器官の細胞分裂に比べ、PP2A のより厳密な活性制御が要求されると言えるのではないだろうか。

第5章 研究に用いた材料と方法

ショウジョウバエの系統

ショウジョウバエは、25℃もしくは17℃で、飼育した。解析に用いたショウジョウバエの系統は次のとおりである。

野生株は、Oregon Rを用いた。本研究に用いた *tw*s のアリルは表 3-1 にまとめた（Uemura et al., 1993; Shiomi et al., 1994）。欠失染色体 *Df(3R)by62* は 85D11-14 から 85F16 までを欠失している。（*tw*s 遺伝子は85F に位置する。）これらの致死変異は、*TM3Sb* あるいは *TM6BTb* でバランスした。

成虫原基の形態形成のパターン、および神経系の異常の解析を行うために、 β ガラクトシダーゼを特徴的なパターンで発現する 4 系統を、マーカーとして用いた（表 4-1）。それらは、ryXho38、PA49、B52、XA12 である。マーカーを用いた成虫原基の表現型の解析には *tw*s⁶⁰ を、神経系の解析には *tw*s⁵⁵ を用いた。*tw*s とマーカー株との交配は、以下の様に行った。第 2 染色体にマーカーがある場合は、図 4-1 の様に行った。致死変異をホモに持ち、かつ、レポーター遺伝子 *lacZ* が挿入された第 2 染色体を少なくとも一本持つ個体が、解析の対象となる。第 3 染色体に *lacZ* マーカーが存在している株（B52、XA12）は、*tw*s⁵⁵ 変異と *lacZ* マーカーを両方持つように組換えを起こした第 3 染色体を作製し、この染色体を持つ個体を解析した。組織中での *lacZ* の発現パターンは、X-gal 染色あるいは抗 β ガラクトシダーゼ抗体を用いた染色で解析した。

FLP/FRT システムを利用したモザイク解析のために、#7 と #2045 の 2 系統を用いた。FLP/FRT システムは、酵母の組換え酵素である FLP Recombinase とその認識部位である FRT 配列をモザイクを作製する個体に導入して、組換えを高頻度で行わせる系である（図 3-12）。#7 系統を酵母の組換え酵素（FLP Recombinase）の発現させるために用いた。この #7 は、ヒートショックプロモーターの下流に組換え酵素がつないである。38℃ 45 分、25℃ 45 分、38℃ 45 分と、断続的に 2 回ヒートショックを与えて酵素を発現させ、組換えを起こさせた。ヒートショックは、2 齢幼虫から、3 齢幼虫中期に行った。

また、組替え酵素の認識配列（FRT）を持つ系統は、#2045（82- π M）系統を用いた（Xu and Rubin, 1993）。この#2045は、*tw*s 遺伝子の近傍でかつセントロメアに近い側に FRT 配列を持つ。

免疫組織化学

成虫原基のホールマウント染色

抗体を用いた成虫原基のホールマウント染色は、次の手順に従った。0.1M リン酸緩衝液、pH7.2（PB）中で3齢幼虫を解剖し、3.7%ホルムアルデヒドを含むPB中で固定した。PBT（PBに0.3% Triton Xを加えたもの）で洗浄後、PBT-BSA（PBTに1% BSAを加えたもの）で室温1時間以上ブロッキングをし、一次抗体は4℃で12時間以上、2次抗体からは、室温で2時間から4時間反応させた。その後の洗いは、PBTで20分ずつ6回以上行なった。その後成虫原基及び中枢神経系を分離してから、退色防止剤（0.01%パラフェニレンジアミン）入り90%グリセロール中に封入し、蛍光顕微鏡、もしくはZeiss laser scanning confocal 顕微鏡で観察した。2次抗体にHRP標識抗体を用いた場合は、0.03% H_2O_2 、0.5 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride（DAB）を含む0.12M Tris 緩衝液、pH7.6（TB）中で数分間発色を行なった。TBで洗浄後、水性マウント剤（GEL/MOUNT、Biomed社）で封入し観察した。

成虫原基のX-gal（5-Bromo-4-chloro-3-indolyl B-D-Galactopyranoside）染色には、組織を2.0%のグルタルアルデヒドを含むカコジレート緩衝液中で固定した。X-gal 反応溶液（3.1 mM $K_3Fe(CN)_6$ 、3.1 mM $K_4(CN)_6$ 、10 mM リン酸緩衝液 pH7.2、0.15M NaCl、1.0mM $MgCl_2$ 、0.2% X-gal）中で、数時間から一晩反応させ（37℃）、水性マウント剤で封入し、観察した。

蛹、成虫のホールマウント染色、DNA 合成の検出

蛹の染色のために、蛹化直後の白い蛹を選び、蛹化後0時間として25℃で解析する

ステージまで発生させた。成虫は羽化後 12 時間以内のものを用いた。それぞれ PBS 中で解剖して、その後は成虫原基の抗体染色のプロトコルに従った。ただし成虫の脳の自家蛍光による観察の時は、固定は modified カルノア液（エタノール：酢酸＝3：1）中で 20 分間行った。なお、22C10 による染色の時は、ブロッキングは 10% FCS が入った PBT 中で行った。

BrdU を用いた DNA 合成の検出は、基本的に Hartenstein らの方法（Hartenstein and Posakony, 1989; Usui and Kimura, 1992）および Amersham の Cell proliferation Kit の方法に従った。蛹の腹部に BrdU を注射し、任意のステージまで発生させた。蛹殻から蛹を取り出し、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.5、PBS）中で頭部、胸部を解剖した。modified カルノア液（エタノール：酢酸＝3：1）で 20 分間固定し、水層に置き換えた後、2 N HCl 中で 30 分間酸処理を行った。この後は抗体染色のプロトコルに従い、抗 BrdU 抗体を用いて染色を行った。

細胞死の検出には、アクリジンオレンジ、もしくはトリパンブルーを用い、Speji の方法に従った（Speji, 1971）。

用いた 1 次抗体のリストは下の通りである。

4D9 engrailed に対するモノクローナル抗体（Patel et al., 1989）

抗 β gal 抗体 β ガラクトシダーゼに対する抗体（CAPPEL）

22C10 神経を染色するマウスモノクローナル抗体（Hartenstein and posakony, 1989）

F2 Cut 蛋白質に対するラットポリクローナル抗体（Blochlinger et al., 1990）

α HRP 抗体 神経系を染色する抗体（Jan and Jan, 1982）

DCAT1 α カテニンに対する抗体（Oda et al., 1993）

24B10 光受容細胞の軸索を染色する抗体（Zipursky et al., 1984）

DCAD2 DE カドヘリンに対する抗体（Oda et al., 1994）

分子生物学的手法

サザンブロット解析

サザンブロットの基本的操作は、Sambrook ら (1989) の方法に従った。ハイブリダイゼーションに用いた液の組成は 50 % ホルムアミド、5 x SSC (20 x SSC は、3M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム)、1x modified Denhart solution (0.02 % polyvinylpyrrolide, 0.02 % Ficoll, 0.002 % heparin)、1 % SDS (Sodium dodecyl sulfate)、20 mM リン酸緩衝液 pH7.2、100 μ g/ml salmon sperm DNA である。ハイブリダイゼーションは、42 °C で一晩行ない、洗いは、0.5xSSC、0.1%SDS中で、65 °C、20 分ずつ、2 回以上行なった。DNA プローブは、ランダムプライマーラベリングキット (T7Quick Prime、Pharmacia) で、作製した。

ノザンブロット解析

グアニジンイソシアネートを使用する CHAOS 法 (Jonas et al., 1985) に従って、全 RNA を抽出した。Oligotex (宝酒造) を用いて polyA+ RNA の調製を行った。ホルムアルデヒドゲル電気泳動、プロッティングとハイブリダイゼーションは、基本的に Uemura ら (1989) の方法にしたがった。メンブレンは Hybond-N (Amersham) を使い、UV 架橋 (UV STRATALINKER、STRATAGENE) で、RNA をメンブレンに固定した。

塩基配列の決定

塩基配列の決定は、Sequenase Ver.2.0 Kit (U.S.Biochemical) を使い、その手順にしたがった。また P エlement 内のプライマーとして、primer #1 (5'-TGAATTTAAGTGTATAC-3') を作製し、このプライマーを用いて *twsp* のゲノム DNA の塩基配列を決定し、P エlement の挿入部位を調べた。

抗体の作製

PP2A の B サブユニットに対する抗体は次の方法で作製した。Gene10:Twsp 融合蛋白質 (TW1; amino acids 80-231) をうさぎに免疫してポリクローナル抗体を作製した。この抗

体は GST-Tws 融合蛋白質(amino acids 80-231)を用いて精製した。また TW1 の inclusion body をラットに免疫して抗血清を得た。

PP2A の触媒サブユニット (C サブユニット) に対する抗体は、蛋白質の C 末端に対応するペプチド(CPAPRRGEPHVTRRTPDYFL)に対して作製した。このペプチドは哺乳類の C サブユニットでも保存されており、実際得られた抗体はマウスのサブユニットに結合できた。抗ペプチド抗体は、Prot On Kit (Multiple Peptide Systems) を用いて精製した。また GST に C サブユニット全長をつないだ融合蛋白質をラットに免疫して抗血清を作らせた。

PP2A の A サブユニットにたいする抗体は、A サブユニットの cDNA 断片(amino acids 439-591) を pGEMEX-1 (Promega)につなぎ、発現させた融合蛋白質をラットに免疫して作製した。

蛋白質の電気泳動とウェスタンブロッティング

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は Laemmli (1970)の方法に準じた。電気泳動後、ニトロセルロース膜に移した後、抗体溶液と反応させて目的とするタンパク質を検出した。なお、ブロッキング、及び抗体の希釈には 5 % のスキムミルク (Difco) を 0.1 % Tween 20 入り Tris 緩衝生理食塩水 (TBS、pH7.6) に溶かしたものを用いた。抗体溶液の洗浄には 0.1 % Tween 20 入り TBS を用いた。発色は Amersham の ECL western blotting detection system を用いた。

Polymerase Chain Reaction 法

PCR法は、サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus) を用いてその方法に従って行った。変性 95 °C で 1.5 分、アニーリング 45 °C で 2 分、伸長反応 72 °C で 3 分の条件で 35 サイクル反応を行った。

tws 遺伝子のゲノム DNA を増幅するために用いたプライマーとして、次の 3 つを作製した。primer #2 (5'-GAATTCTCGTTGCTTCTAGTGCT-3')、primer #3 (5'-GAATTCCACAATACTCCACTGTA-3')、primer #4 (5'-GAATTCATCAATCTAGTTGATAG-3')である (図)。テンプレートには 1 匹のショ

ウジョウバエから抽出したゲノム DNA を用いた。抽出方法は Gloor and Engels (University of Wisconsin, Madison)らの方法に従った。

ショウジョウバエの A および C サブユニットの cDNA クローンは、胚期の cDNA ライブラリ (Zinn et al., 1988) から増幅した。C サブユニットのコード領域を増幅するためのプライマーは、primer #5 (5'-GAATTCATGGAGGATAAAGCAACA-3') と primer #6 (5'-GAATTCAAGGAAATAATCGGGTGT-3') である。A サブユニットの cDNA 断片 (335-591 amino acids) は、次のプライマーで増幅した。primer #7 (5'-CGGGATCCTTGTCTCGGACCCCAAT-3') と primer #8 (5'-CGGGATCCCGCTGCAGCTATGCCGG-3') である。

反応産物はEcoRI処理をした後、もしくはそのまま電気泳動して目的の大きさのバンドを切り出しDNAを回収する。Wizard PCR Prep (Promega) 等を用いて精製後、pBlueScript にサブクローンをするか、TA CloningKit (Invitrogen) を用いて pCRII にサブクローンした。

マウスの B サブユニットのクローニング

マウスの B サブユニット (α 、 β) の cDNA 断片は、Newborn brain 及び Adult Brain の cDNA から PCR 法により増幅した。B サブユニットがクローニングできたプライマーは、primer#12 (5'-GAATTCGCICA(C/T)ACITA(C/T)CA(C/T)AT(A/C/T)AA-3') と primer#16 (5'-GAATTC(G/A)CA(T/C)TC(G/A)AA(T/C)TT(G/A)TC(G/A)AA-3') である (図 3-28)。PCR により得られた α 、 β の cDNA 断片をプローブにして、16 日目胚の脳の random primed cDNA ライブラリー (宮谷、未発表)、成体の脳の random primed + oligo-d(T) cDNA ライブラリー (Clontech) をスクリーニングした。方法は Sambrook ら (1989) に従った。プローブの標識はランダムプライマーラベリングキット (T7Quick Prime、Pharmacia) を用いて行った。

図、表一覧

第 1 章 序論

図 1-1	細胞タイプの多様性を生み出す非対称分裂	35
図 1-2	非対称分裂のメカニズム	36
図 1-3	ショウジョウバエのライフサイクル	37
図 1-4	幼虫期に形成される成虫原基	38
図 1-5	翅原基の発生運命地図	39
図 1-6	2A 型プロテインフォスファターゼのサブユニット構造	40
表 1-1	プロテインフォスファターゼの分類	41

第 2 章 成虫原基のパターン形成遺伝子 *tw*s

図 2-1	成虫原基の構造と発生運命地図	42
図 2-2	<i>tw</i> s ^P の翅原基で見られるパターンの重複	43
図 2-3	<i>tw</i> s ^P ホモ接合体の翅原基での <i>engrailed</i> の発現パターン	44
図 2-4	<i>tw</i> s 変異株の翅原基でのコンパートメント境界の異常	45
図 2-5	<i>tw</i> s におけるパターン重複のモデル	46
図 2-6	復帰変異体の分離	47
図 2-7	<i>tw</i> s の転写単位の同定	48
図 2-8	<i>tw</i> s の cDNA クローンの塩基配列と予想されるアミノ酸配列	48
図 2-9	2A 型プロテインフォスファターゼの構造	50
図 2-10	2A 型プロテインフォスファターゼの B サブユニットの間の類似性	51
図 2-11	Tws 蛋白質の各発生段階における存在量	52
図 2-12	Tws 蛋白質の細胞内局在	53

第 3 章 *tw*s の末梢神経系の非対称分裂における機能

表 3-1	<i>tw</i> s のアリル	54
図 3-1	ショウジョウバエ成虫の機械刺激受容器官	55
図 3-2	機械刺激受容器官（剛毛）の構造図	56

図 3-3	機械刺激受容器官の発生過程	57
図 3-4	成虫腹部の感覚器の構造	58
図 3-5	<i>tw^{ss}</i> の胸部の剛毛の重複形成	59
図 3-6	<i>tw^s</i> のアリルと異常の頻度	60
図 3-7	<i>tw^{ss}</i> に見られる神経細胞の欠失	61
図 3-8	<i>tw^{ss}</i> の感覚器の細胞構成 (1)	62
図 3-9	<i>tw^{ss}</i> の感覚器の細胞構成 (2)	63
図 3-10	<i>tw^{ss}</i> の表現型のモデル	64
図 3-11	B52 マーカーによる細胞分裂の検証	65
図 3-12	FLP/FRT システムを利用したモザイク解析	66
図 3-13	<i>tw^s / tw^s</i> のクローン内での剛毛の重複	67
図 3-14	PCR によるゲノム構造の解析	68
図 3-15	ノザンプロット解析	69
図 3-16	2 A 型プロテインフォスファターゼの各サブユニットの存在量	70
図 2-17	羽の縁 (wing margin) の感覚器	71
図 3-18	複眼における <i>tw^s</i> 変異の影響	72
図 3-19	<i>tw^s</i> の中枢神経系における形成不全	73
図 3-20	成虫の脳のホールマウント像	74
図 3-21	<i>tw^s</i> の脳の異常な有糸分裂像	75
図 3-22	複眼原基からの神経投射と脳内の細胞分裂	76
図 3-23	光受容細胞の軸索の投射パターン	77
図 3-24	神経の投射と視葉 (optic lobe) のプロモデオキシウリジン (BrdU) の 取り込みパターン	78
図 3-25	<i>numb</i> の表現型	79
図 3-26	Numb 蛋白質の娘細胞への不均等な分配	80
図 3-27	<i>tw^{ss}</i> での Numb 蛋白質の分布	81
図 3-28	マウス B サブユニット遺伝子のクローン化に用いた PCR プライマー	82
図 3-29	マウス <i>tw^s</i> ホモログのクローニング	83

第 4 章 総合考察

図 4-1	脳からの粗抽出液のプロテインフォスファターゼ活性	84
図 4-2	<i>tw^s</i> における運命転換とパターン重複	85
図 4-3	<i>tw^{ss}</i> での運命転換のモデル	86
図 4-4	感覚器形成における細胞間相互作用	87
図 4-5	神経母細胞の分裂様式	88
図 4-6	<i>tw^s / Df</i> における成虫原基の形成不全	89

第5章 研究に用いた材料と方法

表 5-1	解析に用いたマーカー株	90
図 5-1	tw^s とマーカー株との交配	91

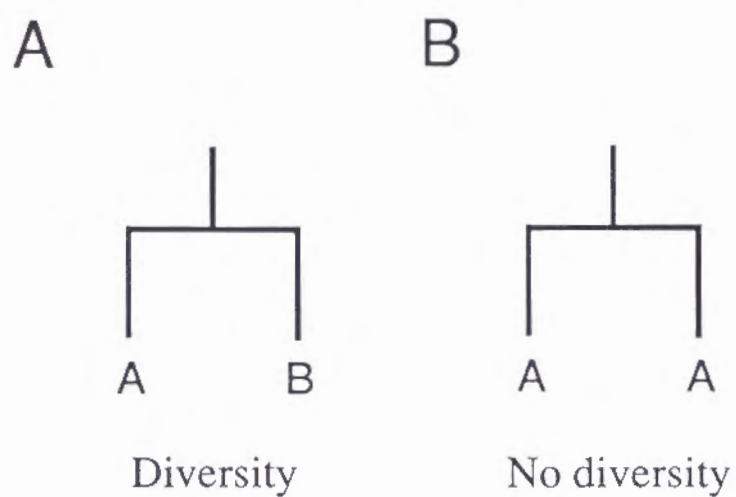


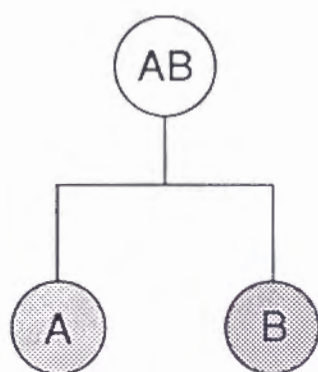
図 1-1 細胞タイプの多様性を生み出す非対称分裂

(A) 分裂して誕生した2個の娘細胞が、異なるタイプの細胞に分化する場合、その分裂を非対称分裂と言う。

(B) 同じ細胞タイプが生まれる対称分裂。

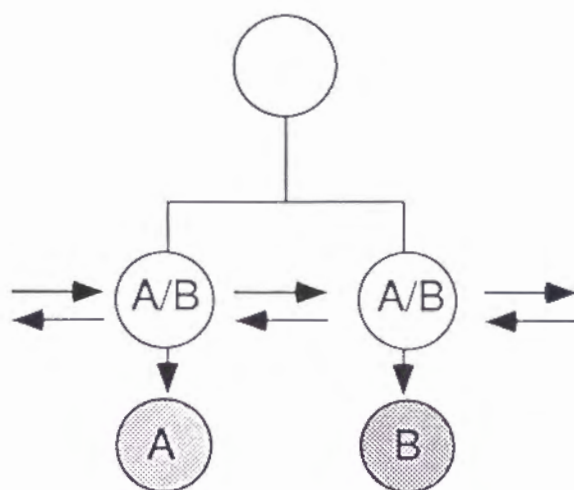
(Horvitz and Herskowitz, 1992)

A



intrinsic

B



extrinsic

図 1-2 非対称分裂のメカニズム

(A) 細胞質決定因子が不均等に娘細胞へ分配される内在的な運命決定機構。

(B) 娘細胞間、あるいは周囲の環境との細胞間相互作用により運命決定がなされる場合。

(Horvitz and Herskowitz, 1992)

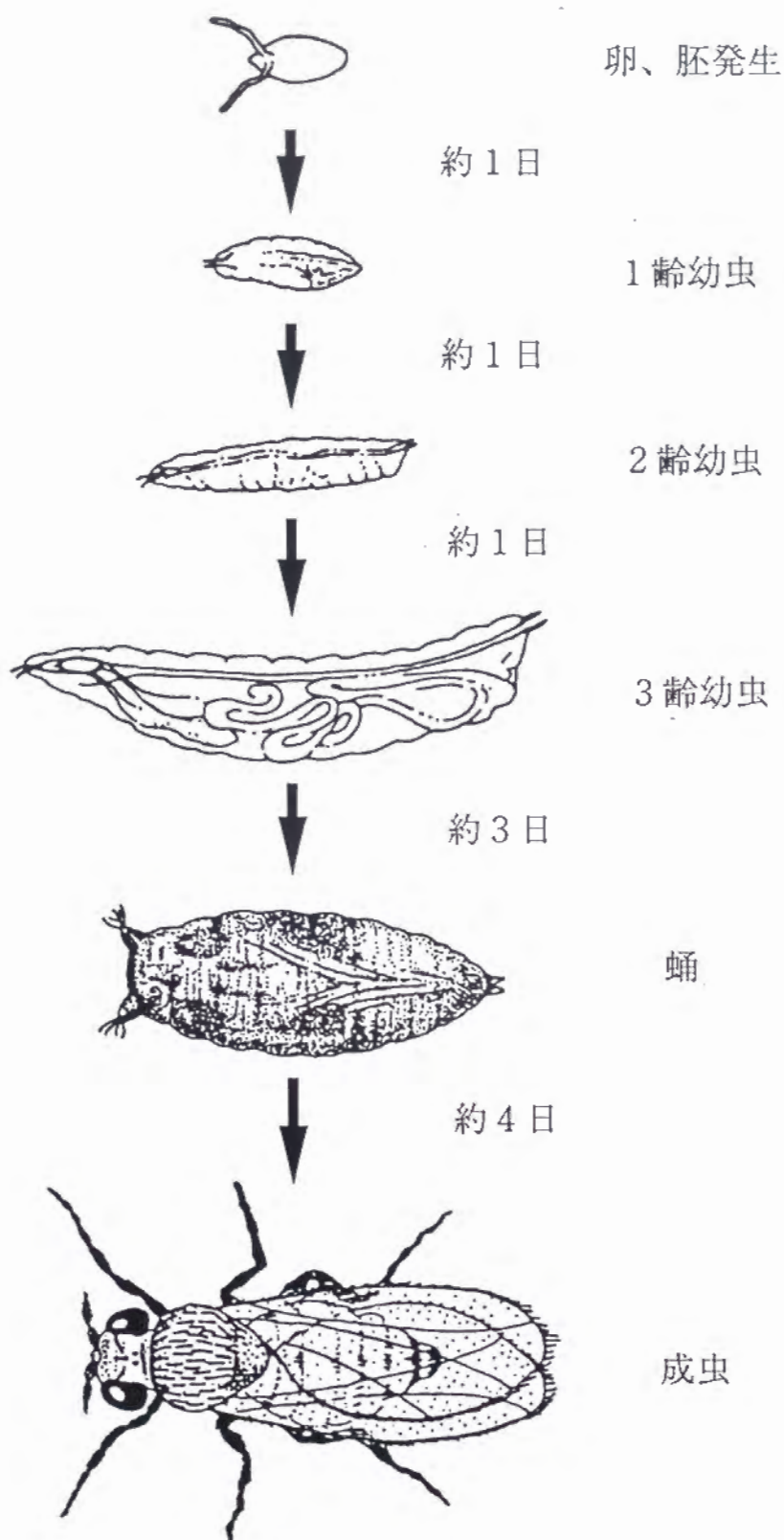


図 1-3 ショウジョウバエのライフサイクル

図には25℃で、各発生段階の成長に要する時間を示した。
胚の長さは約 0.5 mm、成虫の長さは約 3-4 mmである。
Rubin (1988) の図を改変した。

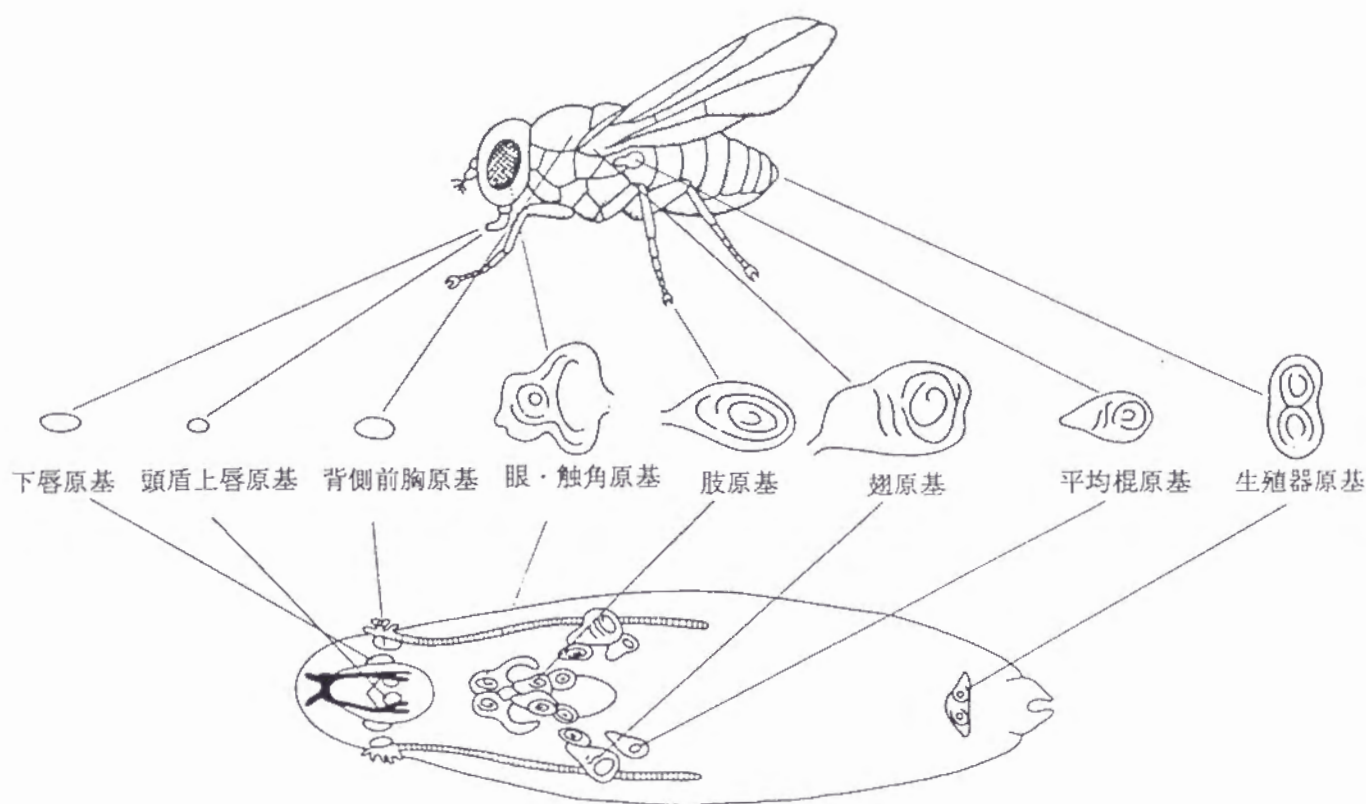


図1-4 幼虫期に形成される成虫原基

幼虫における成虫原基の模式図と、それぞれの成虫原基から形成される成虫の構造を示した。各成虫原基は生殖器原基を除いて左右の1対ずつあり、蛹期に反転・融合してクチクラを分泌して、成虫の表皮構造を形作る。なお、図には3対存在する脚原基のうち、1対のみを示した。Gilbert (1988) の図を改変した。

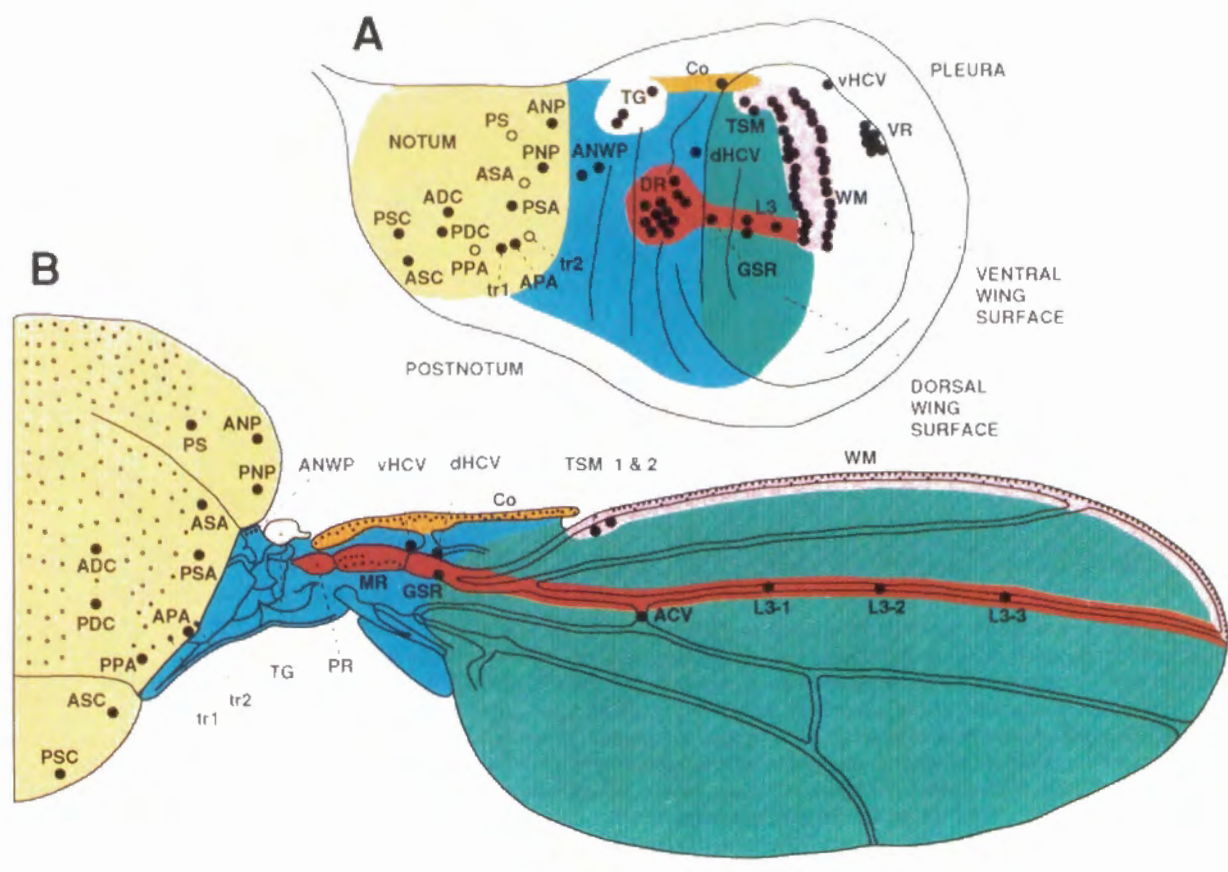


図 1-5 翅原基の発生運命地図

3 齢幼虫の翅原基 (A) とそれから生じる成虫の翅と胸 (Notum) を背から見た図 (B)。同じ色の部分がそれぞれ対応する場所である。また図にかかれた丸点は、誕生する感覚器の場所と名前を示している (図 3-5)。

(Campuzano and Modolell, 1992)

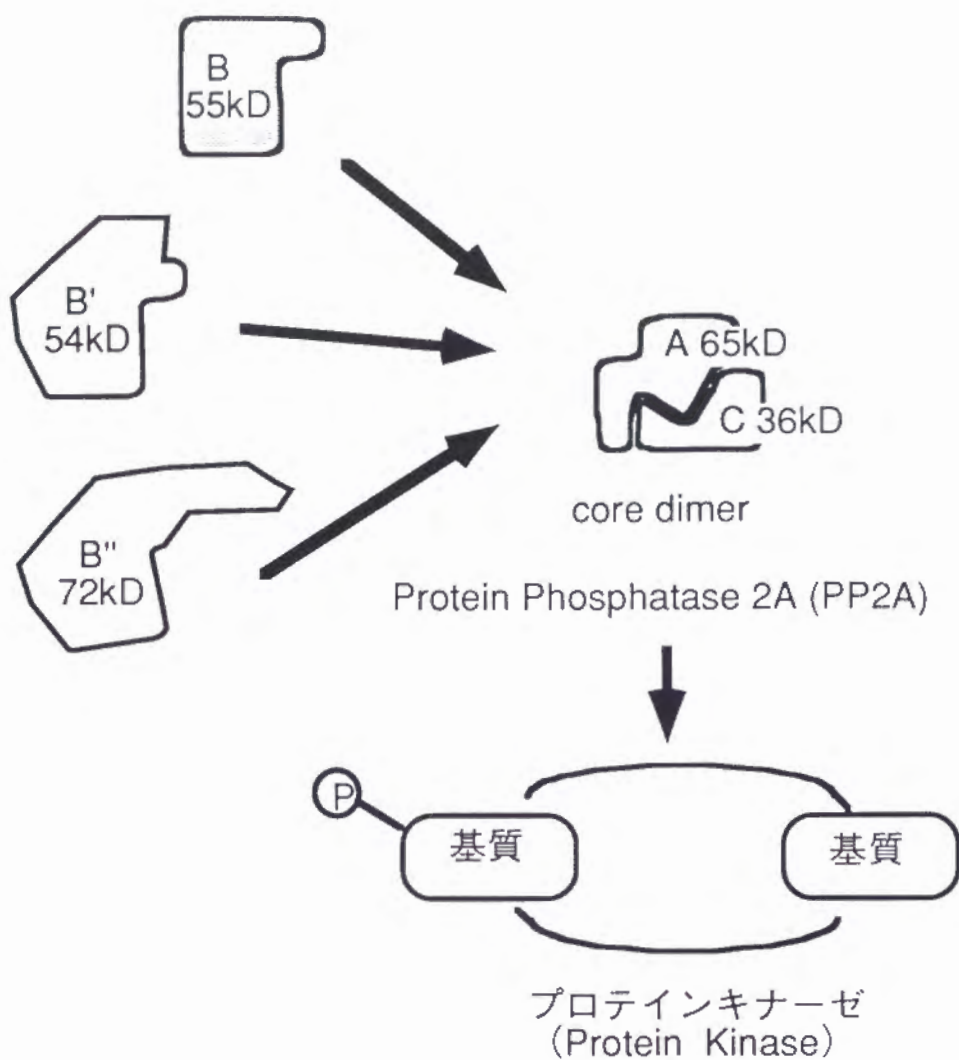


図 1-6 2A 型プロテインフォスファターゼのサブユニット構造

2A 型プロテインフォスファターゼは、触媒サブユニット (C) と調節サブユニット (A) の 2 量体として存在する (core dimer)。この dimer にもう 1 つ調節サブユニット (B、B'、B'') が結合する。脊椎動物の各サブユニットの分子量を併記した。

名称	金属イオン要求性	I-1 と I-2 による阻害	オカダ酸による阻害
1 型	-	++++	++
2 A 型	-	+	++++
2 B 型	Ca ⁺ / カルモジュリン	-	+
2 C 型	Mg ²⁺	-	-

表 1-1 プロテインフォスファターゼの分類

1 型は 2 型よりインヒビター 1 (I-1) とインヒビター 2 (I-2) に対して感受性である。
2 型はさらに金属イオン要求性で分類される。2 A 型がオカダ酸に対して最も低濃度で
阻害される。

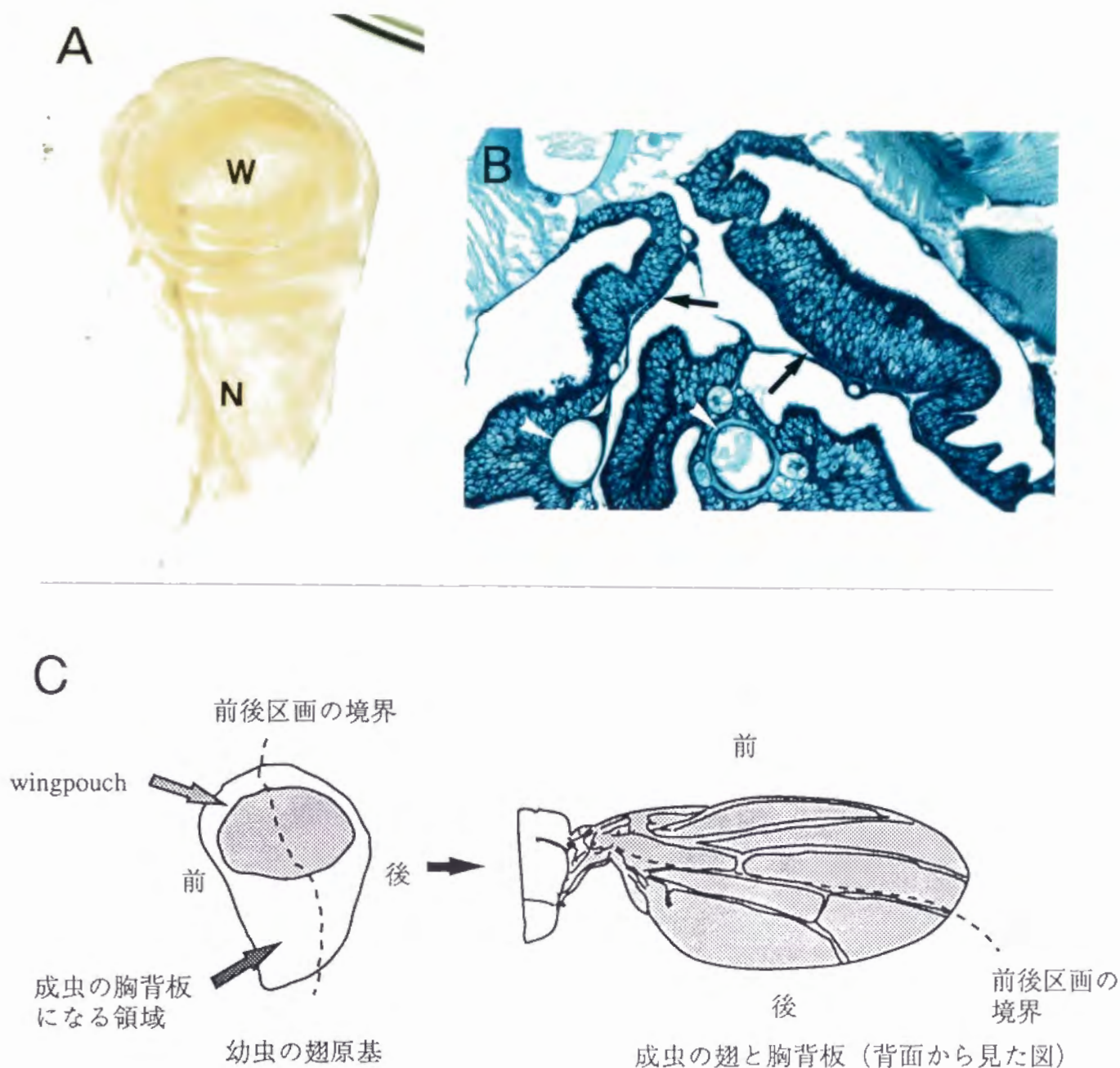


図 2-1 成虫原基の構造と発生運命地図

- (A) 野生株 3 齢幼虫翅原基のホールマウント写真。
成虫原基は、一層の上皮細胞が折り畳まれ、各原基に個有のパターンが形成される。W の部分は成虫の翅に、N は胸 (Notum) になる。これ以降の翅原基の図では、左が前部区画、上が成虫の腹部になるように配置してある。
- (B) 3 齢幼虫の切片像。
左右の翅原基のペアが認められる (矢印)。丸く見えているのは気管の断面である (白い矢じり)。
- (C) 翅原基の発生運命地図。
翅原基の Wing pouch (影付けした部分) からは、成虫の翅ができる。また前後区画の境界を破線で示した。原基の成長過程で細胞がこの境界を越えて混ざり合うことがない。

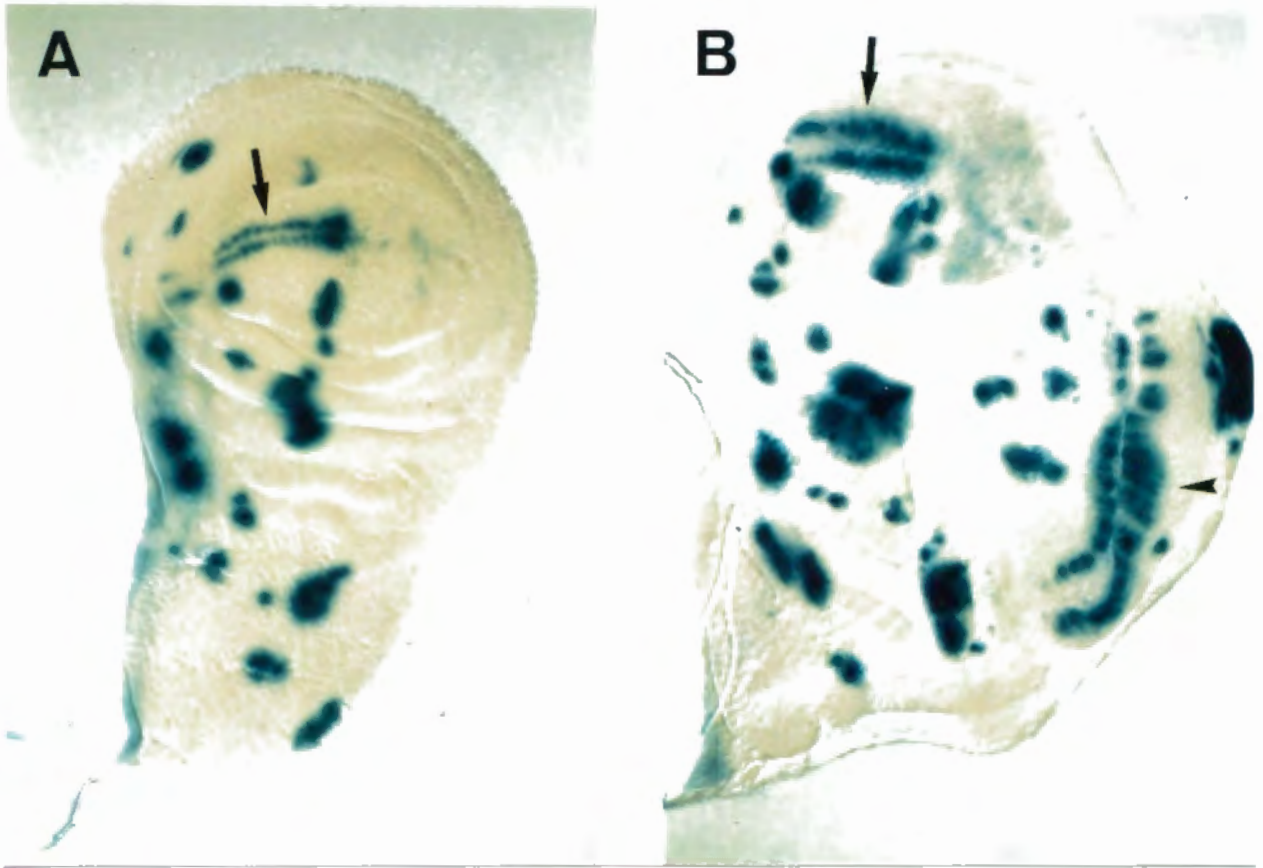


図 2-2 *tws^P* の翅原基で見られるパターンの重複

sca-lacZ マーカーを用いたX-gal 染色を行なった。

(A) 野生型の翅原基。染色される各々の細胞群から、1つの細胞が感覚器母細胞に分化する。成虫の前側の縁に相当する部分 (Anterior wing margin、AWM) に2列の特徴的なシグナルが検出される。(矢印)

(B) *tws^P* での翅原基。AWM 様のシグナルが2ヶ所 (矢印と矢じり) に検出される。

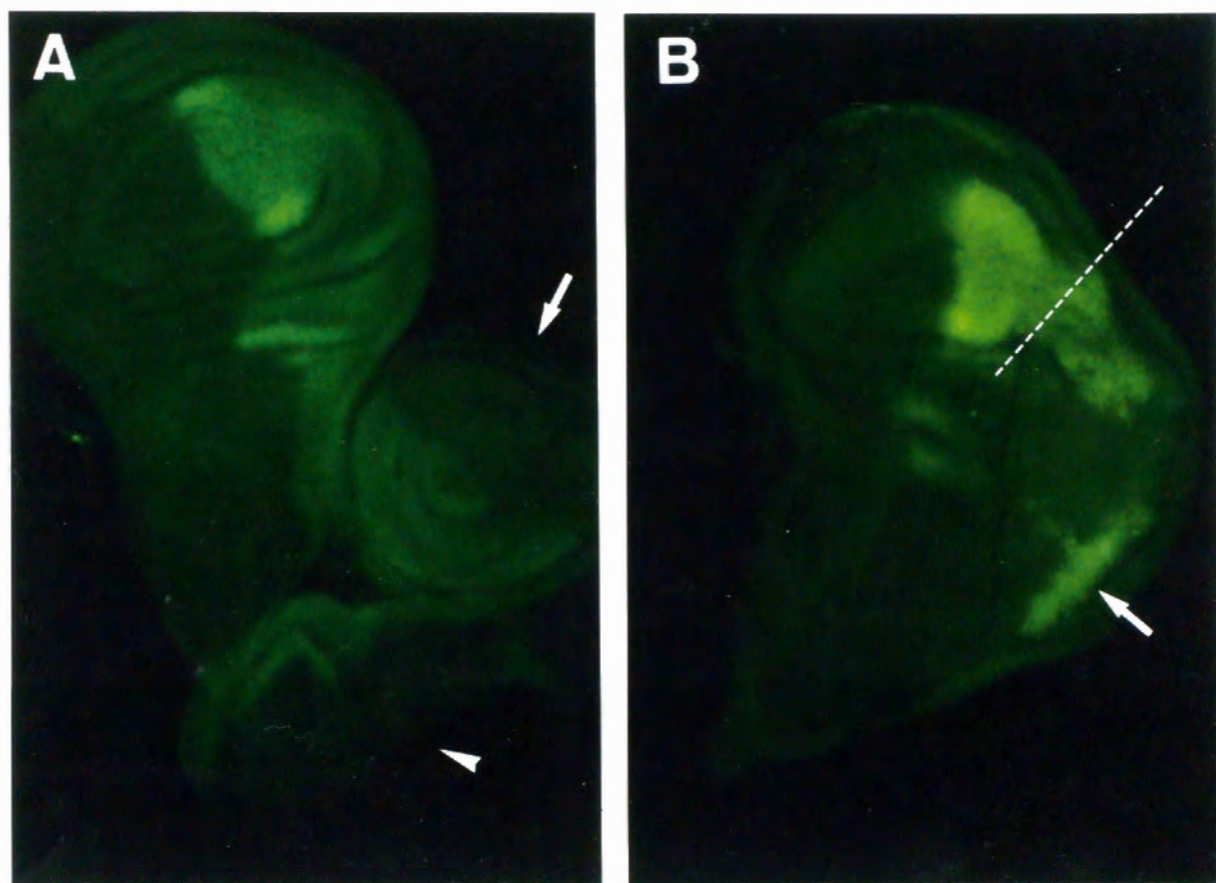


図 2-3 tws^P ホモ接合体の翅原基での *engrailed* の発現パターン

抗 Engrailed 抗体による翅原基の抗体染色を行なった。

(A) 野生株での染色パターン。後部区画の細胞核が染色される。右中は肢原基（矢印）で、右下は平均棍原基（矢じり）である。いずれも後部区画の細胞核が染色される。

(B) tws^P での染色パターン。後部区画側の一部で *engrailed* の発現が消失している。形態から予想できる対称軸を破線で示した。右下の *engrailed* の発現（矢印）は、不完全ながら triplication を起こして、後部区画が形成されたと考えられる。

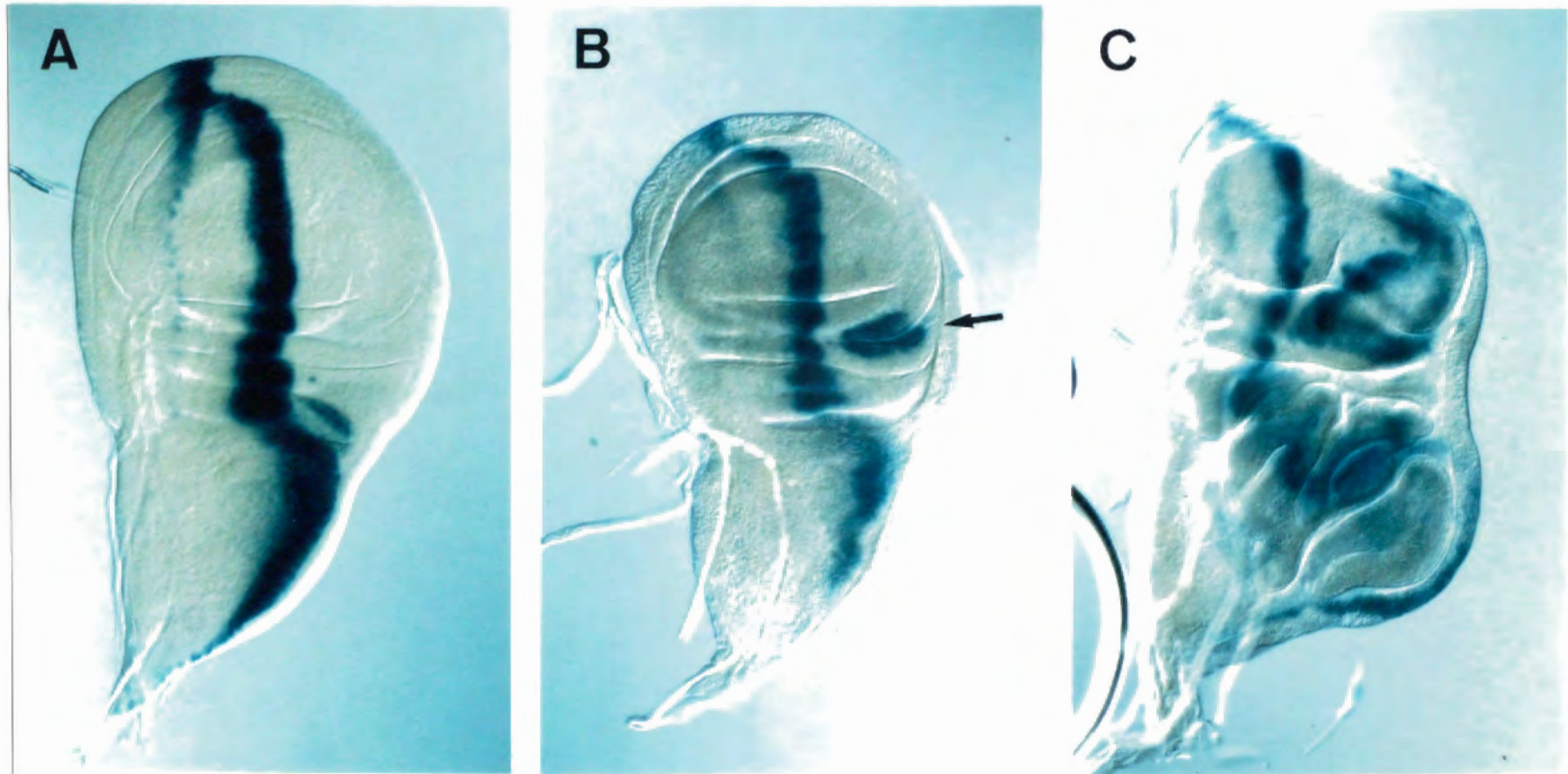


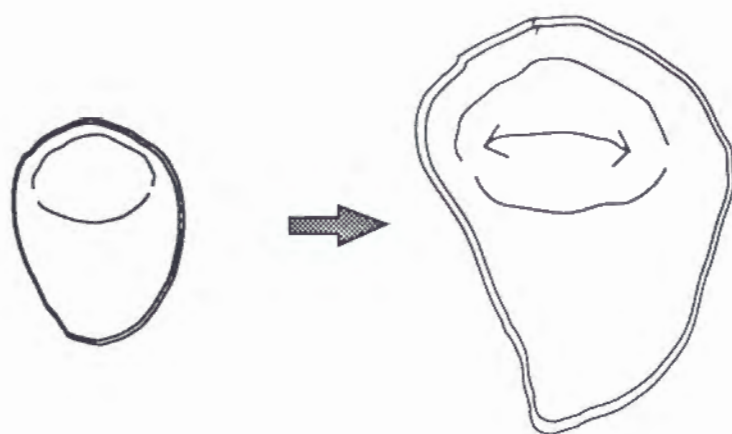
図 2-4 *tws* 変異株の翅原基でのコンパートメント境界の異常

PA49 マーカーを用いたX-gal染色を行なった。

(A) 野生型の翅原基。前後区画の境界に沿ってシグナルが得られる。

(B) と (C) *tws* の翅原基。形態異常が顕著でない場合も後部区画側に異所的な染色（矢印）が見られる（B）。形態異常が著しくなると、後部区画側で、かなり複雑な染色パターンが観察される（C）。

A



B

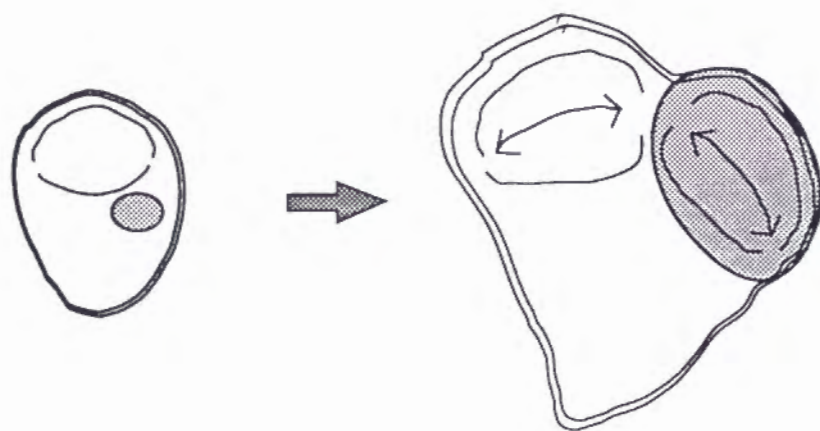


図 2-5 *tws* におけるパターン重複のモデル

- (A) 野生株の成虫原基は幼虫時に増殖し、特有のパターンを形成する。
 (B) *tws^P* では成虫原基の一部（影付けした部分）で運命転換がおこり、翅になる部分が重複する。

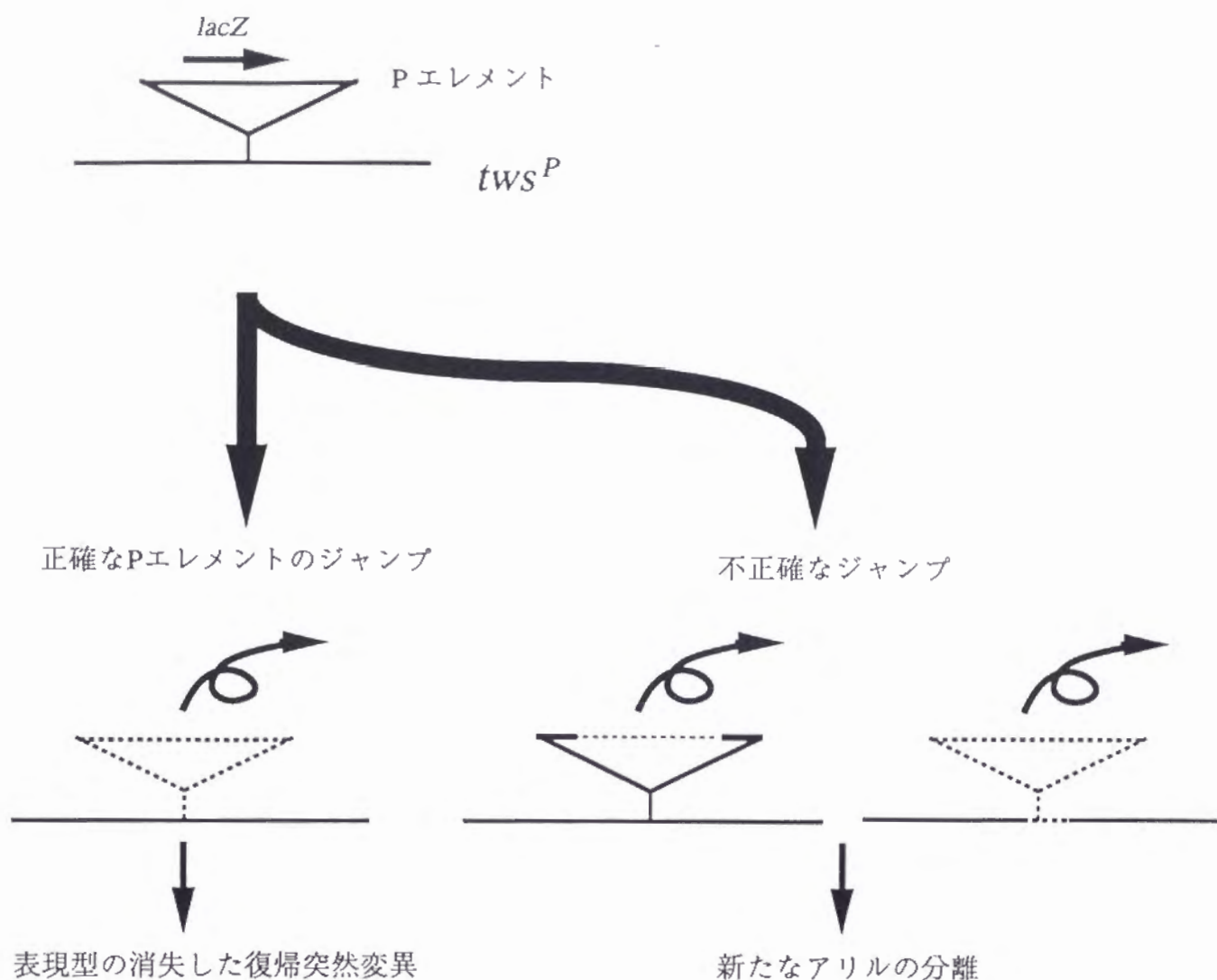


図 2-6 復帰変異体の分離

P エlement がジャンプアウトする時に正確に切り出されると、遺伝子は野生型に回復し、表現型が消失する。一方不正確に切り出しがなされると、遺伝子は不活性化したままで、表現型が残り、新たなアレルが分離できる。事実、*tws^P* 株の P エlement のジャンプアウトにより、表現型が回復した株が得られた。また、蛹期致死となり成虫原基の表現型が残った株 (*tws⁶⁰* など) や、*tws* の新しいアレル (*tws⁵⁵*、*tws⁵⁹*、第 3 章で後述) も複数得られた。

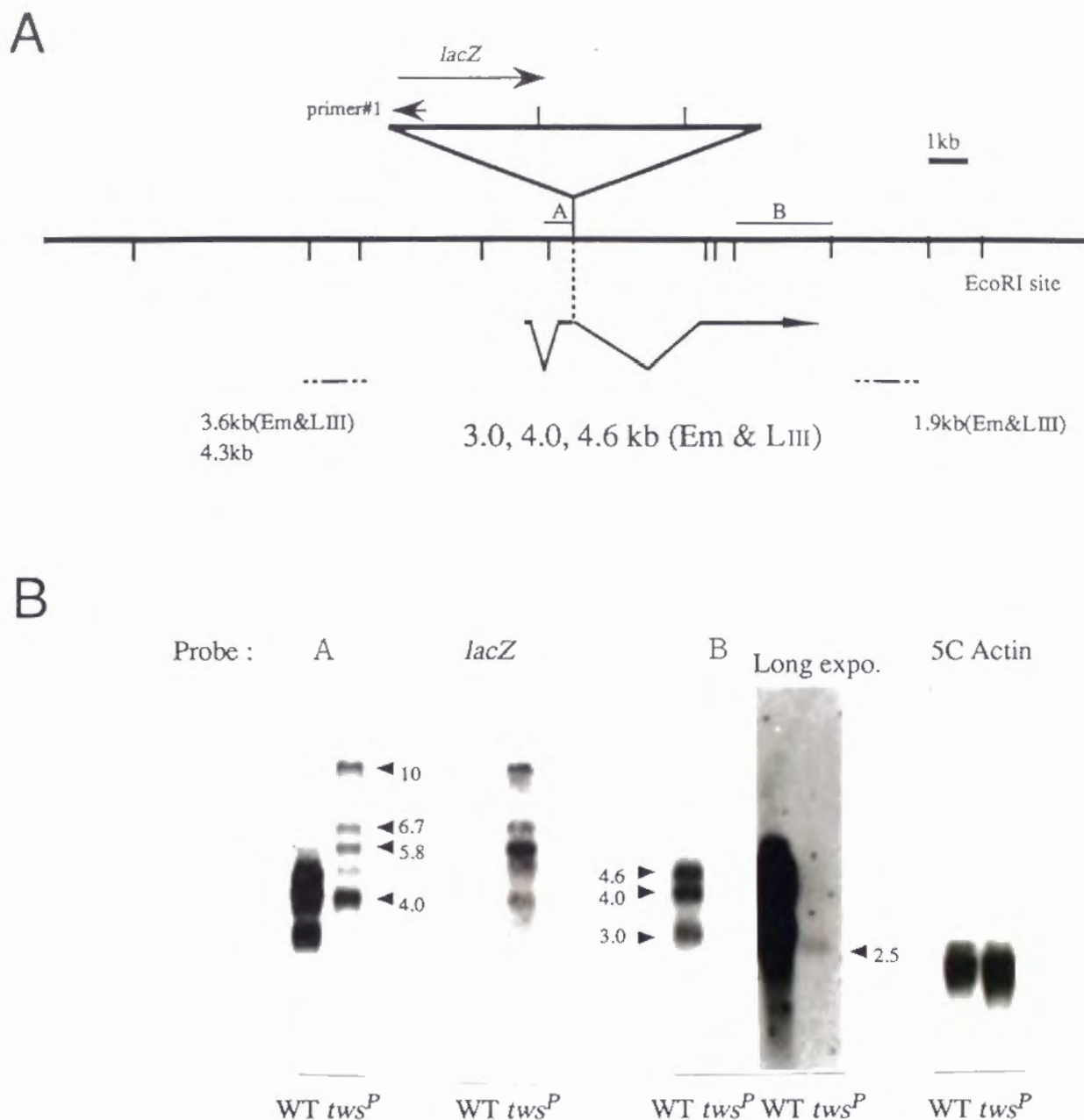


図 2-7 *tws* の転写単位の同定

(A) ノザンプロットで判明した P-*lacW* 近傍の転写単位をまとめた。Em は胚、LIII は 3 齢幼虫の RNA 中に検出されることを示す。図中のプローブ A、および B により、3.0kb、4.0kb、4.6kb の mRNA が検出された。破線は mRNA の末端の位置が不明確なことを示す。primer#1 を用いて、P エLEMENT の挿入部位近傍の塩基配列を決定した。その結果、P エLEMENT はイントロン/エクソンの境界から 4 塩基対離れたイントロン中に存在した。

(B) *tws*^P ホモ接合体と野生株 (WT) の RNA 中の転写産物をノザンプロットで検出した。polyA⁺ RNA は各レーンにそれぞれ約 3 μg を用いた。A、*lacZ*、B はそれぞれ使用したプローブを示す。プローブ B を用いると *tws*^P の RNA 中にほとんど 3.0kb、4.0kb、4.6kb の mRNA は検出できなかった。長時間露出で、2.5kb の弱いバンドが検出された。5C Actin (Fyrberg, 1983) は、どちらの polyA⁺ RNA 中でも検出できた。プローブ A を用いると *tws*^P では野生株では認められない mRNA が検出された。これらは *lacZ* プローブによっても認識されたので、*tws-lacZ* 融合転写産物が存在していることを示している。

1	GAATTCACGGCAATTCGGTAGCTTGGAACTCTTATTGTAAATCTTTCTTCCCTCTACATGCTTAAGTCGTGCTAACACACAAAAATACACA	96
97	ATTAACAAAAGAATCAAAATGCATAAACCAACCGGAAACCAAGTGGTTAATTCAAACGAATTAGTGAAAGAGCGGTATGAAGAAGAAGTGTAAAT	192
193	AATCGCGCTCAACTTTTTGAACTTTAAATTCGGCAGCTAGCAACAAACACCCACCCCGTGAGAAAGACAGCGAGCTAGAGAGCCCAACCACTCG	288
289	CAGCTTCGGTTTGGCTTCTCCTATTGTTGCTGCTGTTTGTGCTGCTGTTTTCGTTGCTTCTAGTCTGCTGTTGTTGTTGTTTATAGCTCCGGC	384
1	* M A G N G E A S W C F S Q I K G A L D D D	21
385	TCCTTAAATCGACGCAAACTGTTCCGTAATAACATGGCCGGTAATGGAGAGGCGTCTTGGTCTTCTACAGATTAAAGGCCCGCTAGACGATGAT	480
22	V T D A D I I S C V E F N H D G E L L A T G D K G G R V V I F Q	53
481	GTCACGGATGCAGACATCATATCCTGCGTGGAAITCAATCAGATGGCAGCTGCTGGCCACTGGTGACAGGCGCGTCCGCTCGTCATCTTTACG	576
54	R D P A S K A A N P R R G E Y N V Y S T F Q S H E P E F D Y L K	85
577	CGTGATCTCGCTCAAAAGCCGCCAATCCGAGACCGCGCAATACAAITGCTATTTCGACATTCGAATCGCACGAGCCCGAATTCGACTACCTCAAG	672
86	S L E I E E K I N K I R W L Q Q K N P V H F L L S T N D K T V K	117
673	TCCCTGGAGATTGAGGAGAAGATAACAAGATCCGGTGGCTGCAACAAAAGAAATCCGTGCACTTTCTGCTCTCGACCACGACAGACAGATTAAA	768
118	L W K V S E R D K S F G G Y N T K E E N G L I R D P Q N V T A L	149
769	TTGTGGAAGCTCAGTGAGCGTGACAAGTCGTTCCGCGGCTACAACACGAAGGAGGAGAACGGTCTGATCCGGGATCCACAGAATGTAACGGCCCTC	864
150	R V P S V K Q I P L L V E A S P R R T F A N A H T Y H I N S I S	181
865	CGAGTGGCATCCGTGAAGCAGATACCCTGCTGGTGGAGGCGTCCCGACGGCGCACTTCGCCAATGCACACACCTATCACATCAATTCATAAAGC	960
182	V N S D Q E T F L S A D D L R I N L W H L E V V N Q S Y N I V D	213
961	GTTAATTCGGATCAGGAGACCTTCTTGTGCGCGGACGACCTGCGGATCAATCTGTGGCACTTGGAGGTGGTCAACCAGAGCTACAACATTGTGAC	1056
214	I K P T N M E E L T E V I T A A E F H P T E C N V F V Y S S S K	245
1057	ATCAAGCCAACCAACATGGAGGAGCTAACAGAGGTGATCACCGCGCGCAATTCATCCGACCGAGTGCAATGTGTTTGTCTACTCGAGCTCTAAG	1152
246	G T I R L C D M R S A A R C D R H S K Q F E E P E N P T N R S F	277
1153	GGCACAATACGATTATGTGATATGCGTTCCGCGCGCGGATCGGACCGGCACAGCAACAGTTCGAGGAGCCCGAGAATCCAACGAATCGCAGCTTT	1248
278	F S E I I S S I S D V K L S N S G R Y M I S R D Y L S I K V W D	309
1249	TTACGCGAAATAATCAGCTCCATCAGCGATGTGAAGCTAAGCAACTCGGGTCCGTACATGATCTCCAGGGATTACTTGAGCATCAAAGTGTGGGAT	1344
310	L H M E T K P I E T Y P V H E Y L R A K L C S L Y E N D C I F D	341
1345	CTGCATATGGAACAAAGCCCATGAGACCTATCCGGTTCATGAATACCTGCGCGCAAGCTGTGTTCCCTGTACGAGAATGACTGCATCTTCGAC	1440
342	K F E C R W N G K D S S I M T G S Y N N F F R V F D R N S K K D	373
1441	AAGTTCGAGTGCCGTTGGAACGGCAAGGACGCTCAATAATGACCGGAAGCTACAACAACCTTCTTCCGCGTCTTCGATCGCAACTCGAAAAAGGAT	1536
374	V T L E A S R D I I K P K T V L K P R K V C T G G K R K K D E I	405
1537	GTGACGCTAGAGGCGTCCAGGACATCATCAACCGAAACGGTGCTTAAGCCAGGAAAGTTTGCACTGGCGGCAACGAAAGAAGGATGAGATC	1632
406	S V D C L D F N K K I L H T A W H P E E N I I A V A A T N N L F	437
1633	AGCGTGGACTGTCTAGATTTCACAAGAAGATCCGACACCGCGTGGCACC CGCGAAGAAATATCATCGCCGTGGCTGGCAGCAATAACCTCTTC	1728
438	I F Q D K F *	443
1729	ATATTTTCAGGATAAATTTTAGCCAACACTCTCACAAGAACCACACCATACGCCACAATCACACAAGCAACTATCTACAGAAACCAAGAAGT	1824
1825	ACGATCACGCCCTCATTCTTATGTTAAATTAATCGGTTTGTTCCTTCAAATAGTTTCAAATTTCACTTGCAATCAAATGTTTGCCTAACACCATTAC	1920
1921	CTCAGGCCACCCCTTATGCCCTATCCCGAGCGATGTTCTCCTTCCCGCCCCAAACAAATTACATCATACATAATGCCATAGCAAAAGCTTTGTAATG	2016
2017	TATTTCTCGCGTGTATGCGTATAACGAGAAACAATACCAGAACTTAAGAGATCGAAACAAATTTTATACATTACATTTATAAATAGTGAAGCGT	2112
2113	ATATTTGATTTCATGTAGCGCAATTCAAAAACCCACAATAAGAGTAATATAATTATGTAGCTATTGATTTCGCCGAAATTTTGTATAATTAGCG	2208
2209	CCTACCCCCGGAATTTTGAATAAAAGATAAATAATACACATAAAAAATAAATCATAAAATGCATGTTGTAAACATTTTTCGTTCCGCTT	2304
2305	GTTAAGTTTACGATGAAAAGTCAAGAAACATATGCGCCCTGTTTGCTCTACTTTATAAATATAGACTAAACACGAATTTCCGATTGTTTATTCGTT	2400
2401	TGACAACGTTTCATCCATGCAAAAGAGACGATAGCGCGCGGAGCTTTGTGCGTGCATATGTTGTTCTATTTTAAATCTCATCAGCAACGTCAGC	2496
2497	AATCGAACAGCCGGAAGTTGTTCTCAGTCAAACCAATTTAAAAATGCTCATTTAAACACTTAATAAATTCACATAAGAACCAATGCTAGCTAGACCAG	2592
2593	AAAGCAGAAGTCAAGAGATGAGAGCAAAACGCGGAAGTATAAAATAGATGCATTGATAACGTATGCATCGCAGTTAATTGATACCTACATATA	2688
2689	CATATNAAAAAACGACGCTAAGTTTAAAAACAAATTAGTGTTCTCAATTCGTTTATTGAAAGTCTATCTGAATGAGAGAAACAAAGAAAAA	2784
2785	AAACAATAATAAGAAATACTATTTTATACGCTACATTTAAAGCTAAGTATTGCTACTTTAGTTCAACAGGCGTGGCTGGCTCCAAGCAATTT	2880
2881	CTCACATATAGTCTATTGCCCCCTTGGCCCCGCCCCCTTTTCAICGGTCAACAACCTTTCCAGCGAGTGTCTTACTGTTTTGTAAGTTTCTTGTA	2976
2977	TTCAITGTCTGTTTTCATAAAGAAGTATAAACAACCAACATTTTATAGGTTATCTAGTGTCTAGTGTTAACAATAAAAAACAAACAAAC	3072
3073	AAATTATAAAAACGCAACCAATAAAGGAATTC	3104

図2-8 *tws*のcDNAクローンの塩基配列と予想されるアミノ酸配列

決定した塩基配列と、予想されるアミノ酸配列を示した。*は、同一読み取り枠の最も近傍の終止コドンを示す。

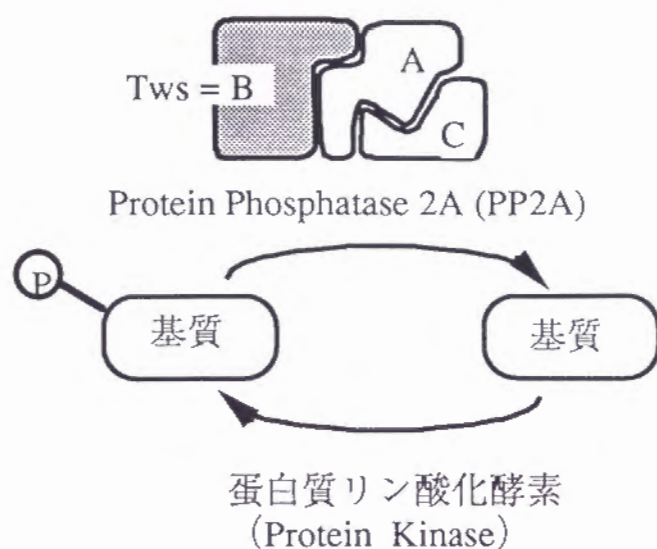


図 2-9 2A 型プロテインフォスファターゼの構造

2A 型プロテインフォスファターゼは、触媒サブユニット (C) と 2 つの調節サブユニット (A、B) からなる。B サブユニットは A サブユニットを介して、触媒サブユニットの活性を調節している。

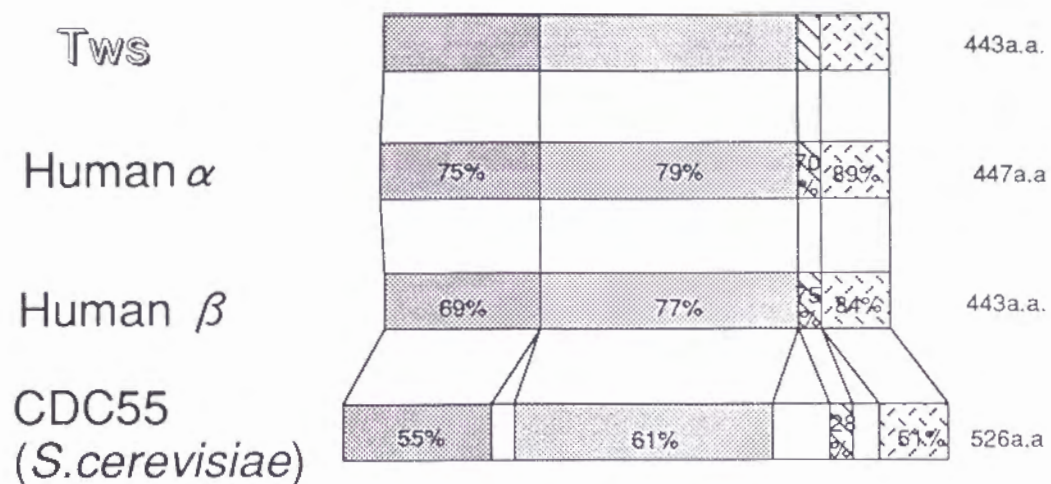


図 2-10 2A 型プロテインフォスファターゼの B サブユニット間の類似性

図 2-8 に示したアミノ酸配列を 4 つのセグメントにわけ、それぞれで種間の相同性を比較した。*tws* のアミノ酸配列に対する類似性 (identity) を記載した。

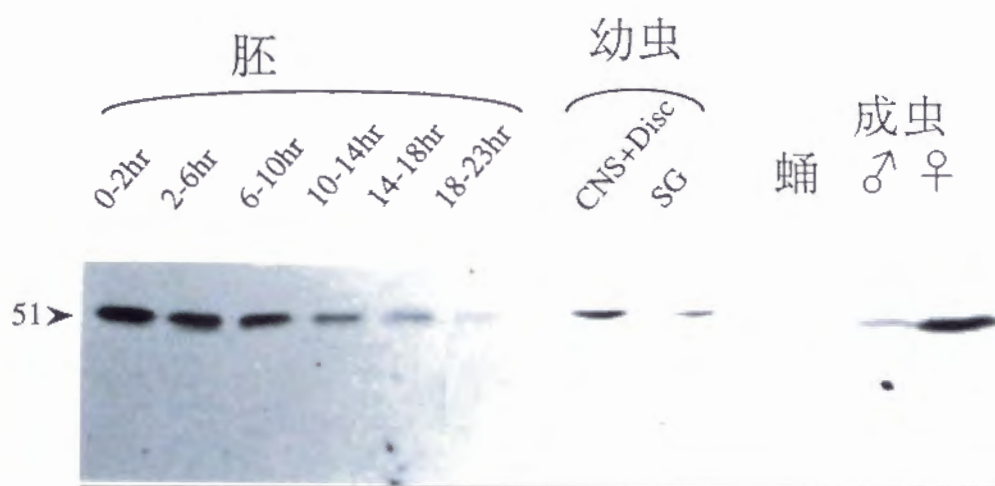


図 2-11 *tws* 蛋白質の各発生段階における存在量

tws 蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。
 51kD の *tws* 蛋白質は胚発生初期から多量に存在する。3 齢幼虫では成虫原基 (Disc) と中枢神経系 (CNS)、唾腺 (SG) を濃縮した分画に多く存在していた。

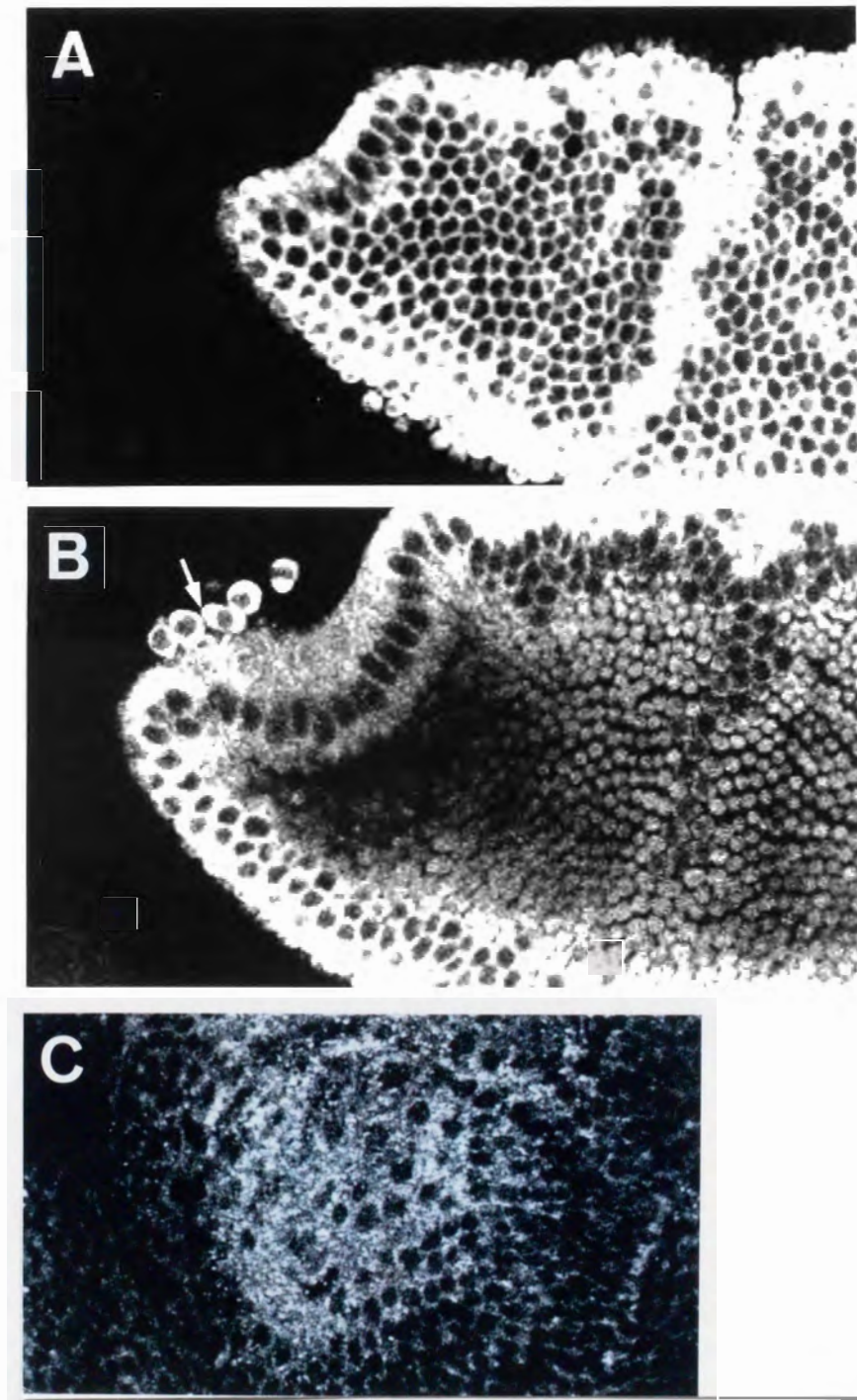


図 2-12 *tws* 蛋白質の細胞内局在

(A、B) ステージ 6 の胚の *tws* 蛋白質に対する抗体による染色像。(B) は (A) より深い面に焦点をあわせた像であり、細胞質に局在したシグナルが極細胞 (矢印) でも検出できる。

(C) 3 齢幼虫の脚原基の抗 *tws* 蛋白質抗体による染色像。成虫原基でも原基全面で一様に細胞質に存在する。

アリの組合せ	表現型と主な図	ゲノム構造または文献
<i>Df(3R)by62</i> ホモ	胚致死	欠失染色体を持つ株
<i>tw^{sP}/Df</i>	成虫原基の形成不全 (図 4-6)	Uemura et al., 1993
<i>tw^{sP}</i> ホモ	成虫原基のパターン重複 (図 2-2)	蛹期致死 P エlement 挿入変異 (図 2-7) Uemura et al., 1993
<i>tw^{s60}</i> ホモ	成虫原基のパターン重複	蛹期致死 P エlement の内部欠失 (図 2-6) Uemura et al., 1993
<i>aar^l</i> ホモ	神経母細胞の細胞分裂の阻害	幼虫致死 Gomes et al., 1993
<i>tw^{s55}/Df</i>	機械刺激受容器官の重複 (図 3-6)	成虫致死 Shiomi et al., 1994
<i>tw^{s55}</i> ホモ	機械刺激受容器官の重複 (図 3-9 (C))	成虫致死 P エlement の一部が残存 (図 3-14) Shiomi et al., 1994
<i>tw^{s59}</i> ホモ	機械刺激受容器官の重複	成虫致死 イントロンの一部が欠失 (図 3-14) Shiomi et al., 1994

表 3-1 *tw^s* のアリル

tw^s のアリルの組合せを示す。下の段ほど遺伝子活性が残存していて、弱い表現型を示す。*aar^l* は同一染色体上の他の遺伝子に致死変異が生じているため、ホモ接合体は幼虫期の早い時期に死ぬ (Ohkura ら、未発表)。



図 3-1 ショウジョウバエ成虫の機械刺激受容器官

野生株成虫の胸部背中の実体顕微鏡写真。機械刺激受容器官（剛毛）は、長いマクロキータ（矢印）と、短いマイクロキータ（矢じり）の2種類にわけることができる。

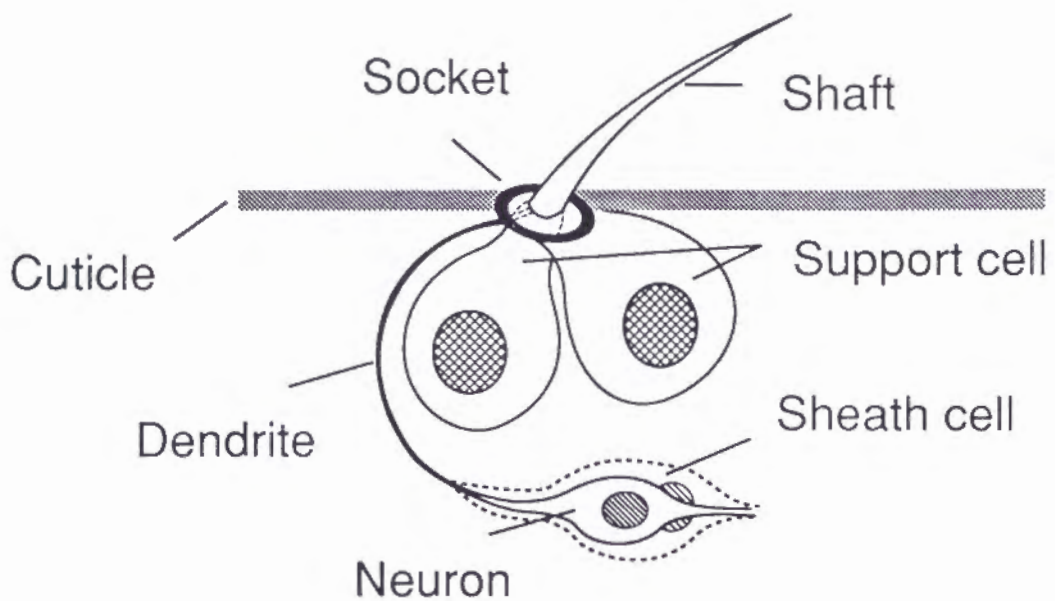


図 3-2 機械刺激受容器官（剛毛）の構造図

機械刺激受容器官は4つの細胞から構成される。それらはソケットとシャフトを形成する支持細胞（Support cell）、神経細胞（Neuron）、そして鞘細胞（Sheath cell）である。支持細胞はクチクラ（Cuticle）直下に位置し、周囲を表皮細胞が取り囲んでいる。支持細胞は細胞分裂を伴わないDNA複製（endoreplication）を起こして、サイズが大きくなる。

A

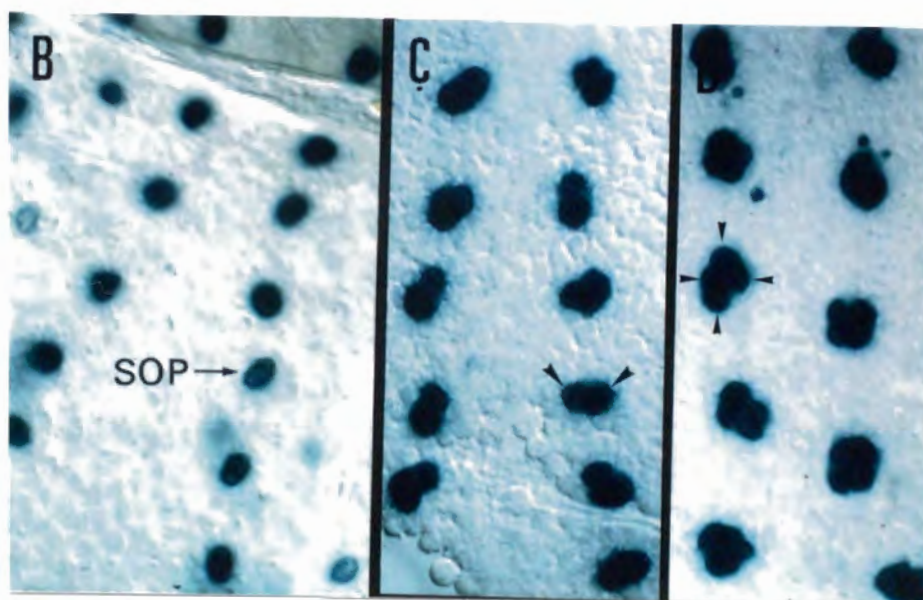
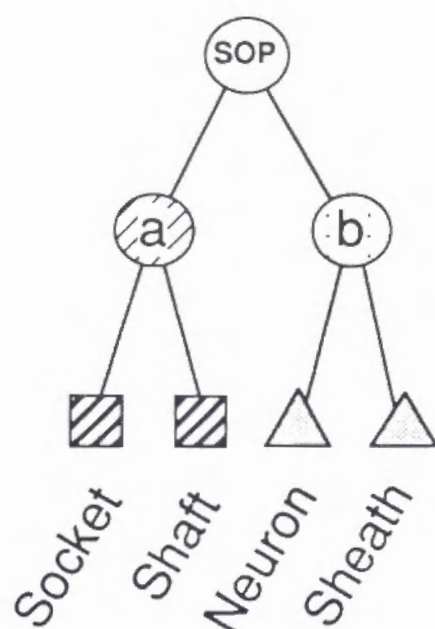


図 3-3 機械刺激受容器官の発生過程

(A) 感覚器母細胞 (SOP) から2つの2次前駆細胞 (a、b) ができる。a cell からはソケットとシャフトをつくる支持細胞が、b cell からは神経細胞 (Neuron) と鞘細胞 (Sheath) が誕生する。

(B、C、D) B52 マーカーを用いたマイクロキータの SOP の分裂パターン。蛹化後 (APF) 約 19 時間後 (B)、約 21 時間後 (C)、(D) 約 25 時間後の胸部の正中線付近。感覚器母細胞の2回の分裂により4つの細胞が生まれ、これらが1つの感覚器を構成する。分化が始まる以前には、SOP、2次前駆細胞、そして4つの娘細胞のいずれも、細胞の形や大きさで区別できない

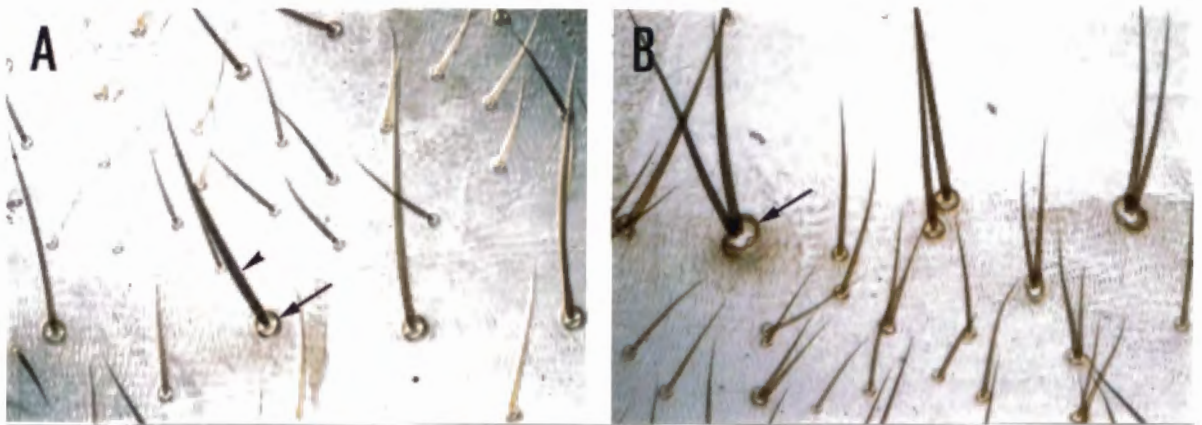


図 3-4 成虫腹部の感覚器の構造

(A) 野生株の腹部の機械刺激受容器官。ソケット（矢印）とシャフト（矢じり）から構成される。

(B) *tws⁵⁵* では、剛毛の重複が見られる。一部のソケットは融合して大きくなっている（矢印）。

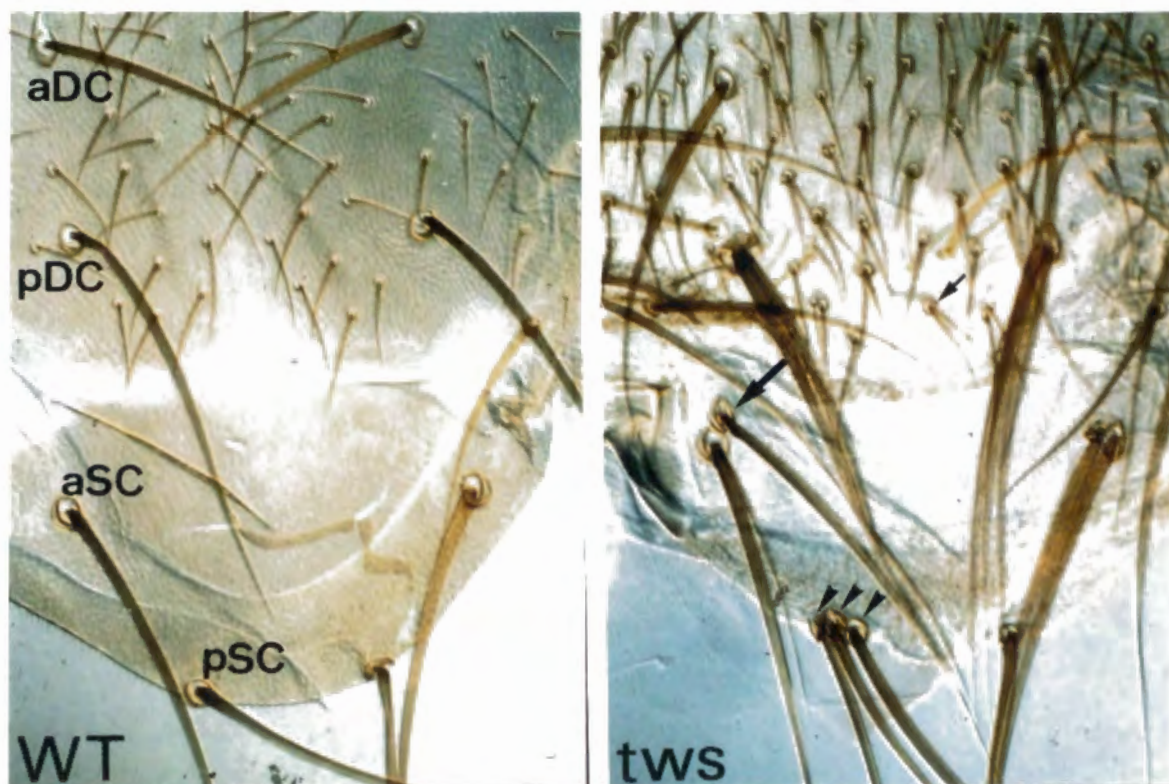


図 3-5 tws^{55} の胸部の剛毛の重複形成

(WT) 野生株の成虫胸部の背中側からの写真。上が頭部、下が尾部側になる。各マクロキーテには名称が付けられている。aDC、anterior dorsocentral; pDC、posterior dorsocentral; aSC、anterior scutellar; pSC、posterior scutellar

(tws) tws^{55} の胸部 (Notum) のクチクラの写真。 tws^{55} 変異株では、マクロキーテとマイクローキーテのいずれにも剛毛の重複が見られる (例をそれぞれ大きい矢印と小さい矢印で示した)。3 組のソケットとシャフトが形成される場合もある (矢じり)。

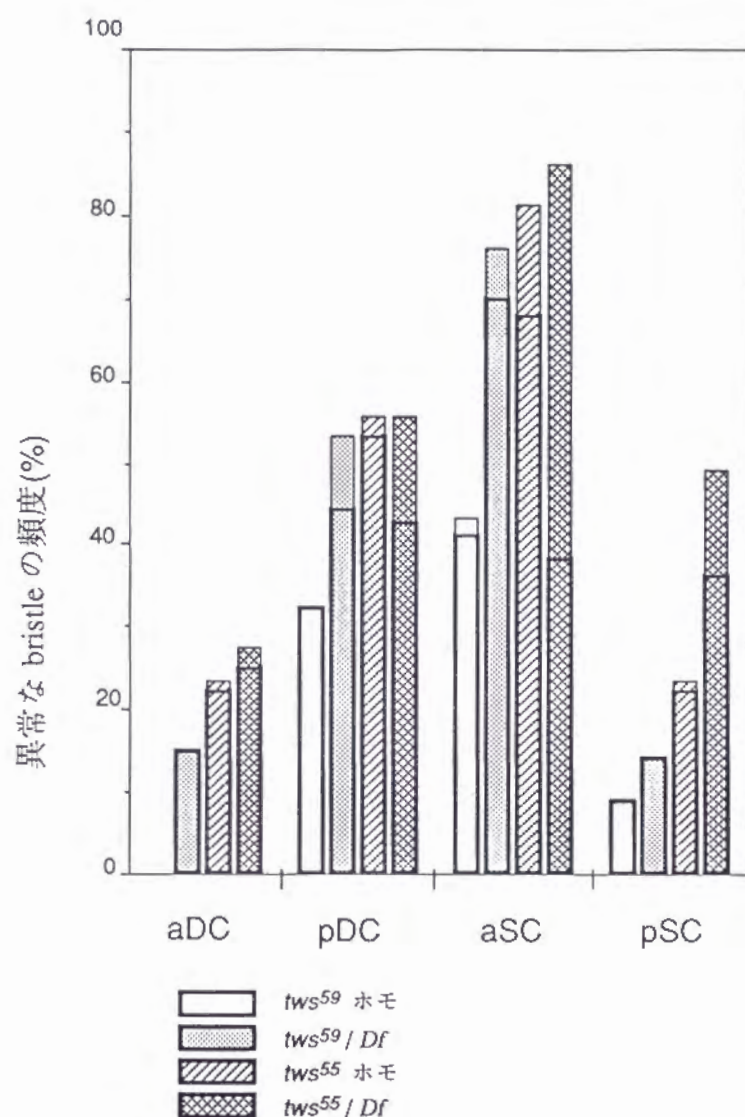


図 3-6 *tw5* のアリルと異常の頻度

tw5 のアリルのそれぞれの組合せで検出できる胸部のマクロキータ (aDC から pSC まで、図 3-5) の異常の割合をグラフに示した。*Df* は *tw5* 領域の欠失染色体を示す。バーの太線で囲まれた部分は、剛毛の重複 (duplication) または triplication がおきる場合である。その上部の細い線で囲まれた部分は、1 本のシャフトに大きなソケットが付随して出現する (a single shaft with a large socket) 頻度である (本文参照、図 3-9 (C))。

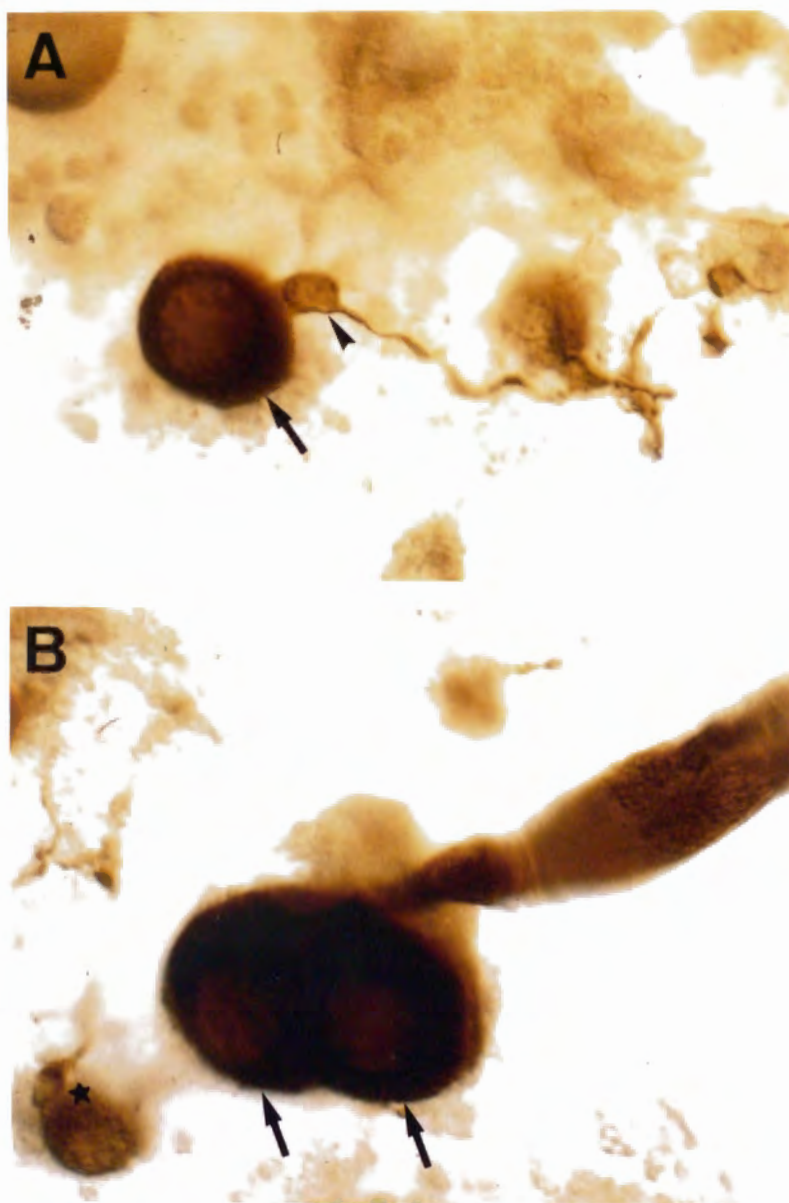


図 3-7 *tws⁵⁵* に見られる神経細胞の欠失

(A) 正常な機械刺激受容器官の染色像（蛹化後 37hr.）。大きなシャフト細胞（矢印）と神経細胞（矢じり）が染色される。

(B) *tws⁵⁵* ホモ接合体の重複したシャフト細胞（矢印）。神経細胞は付随していない。星印はすぐそばにあるマイクロキータの細胞で、その感覚器の細胞構成は正常である。

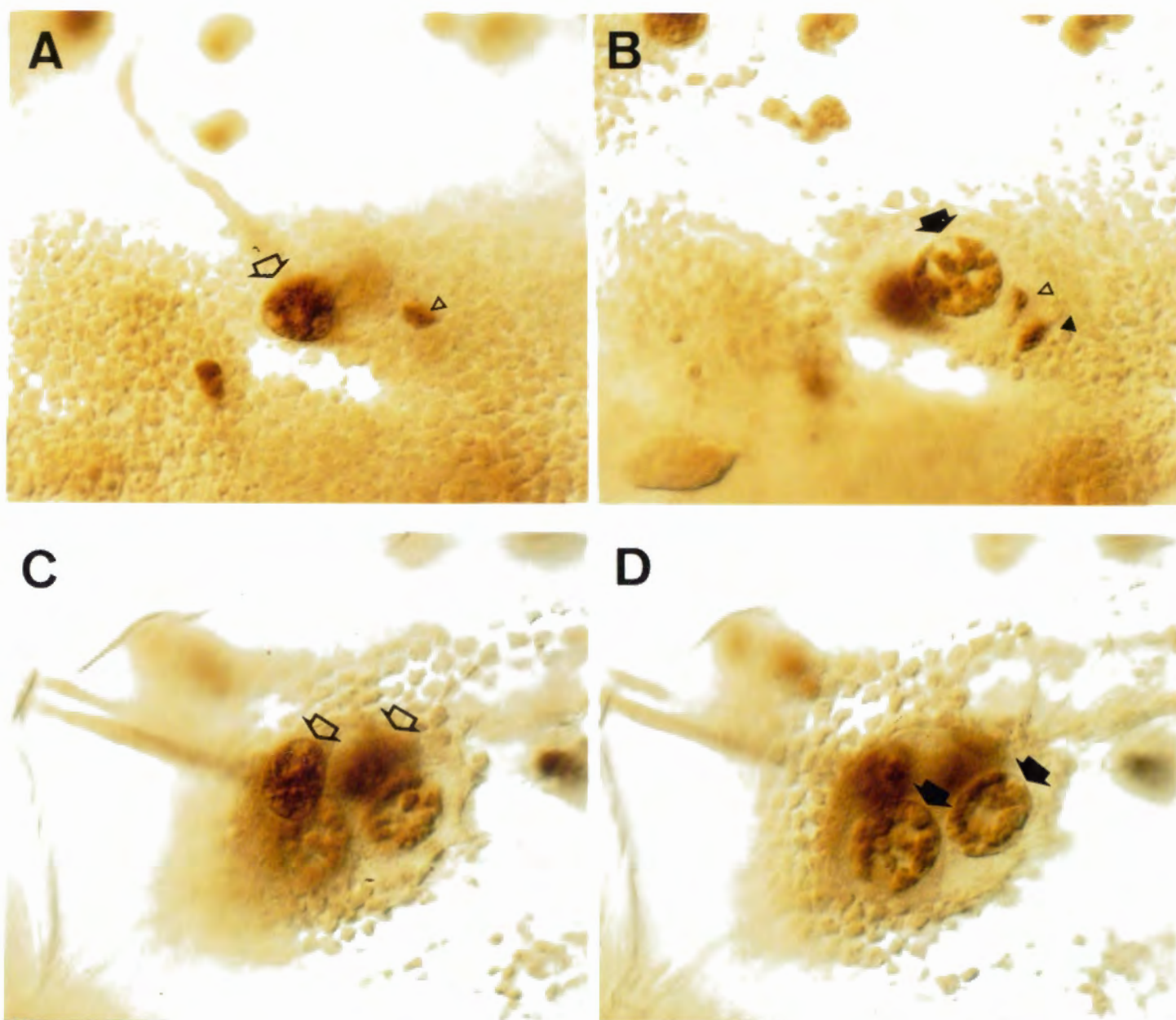


図 3-8 *tws⁵⁵* の感覚器の細胞構成 (1)

(A、B) 正常な機械刺激受容器官の α CUT 抗体による染色像 (蛹化後 40 hr.)。支持細胞は endoreplication を行い核のサイズが大きくなる。ソケット細胞の核 (A、中抜き矢印) は、シャフト細胞の核 (B、矢印) より濃く染色される。神経細胞 (矢じり) と鞘細胞 (中抜き矢じり) の小さい核が付随している。(B) の焦点面は (A) よりも深い。

(C、D) *tws⁵⁵* ホモ接合体の感覚では、大きいソケット細胞とシャフト細胞の核が 2 個ずつ存在している。神経細胞と鞘細胞の核は確認できない。(C) と (D) の焦点面はそれぞれ (A) と (B) に対応している。

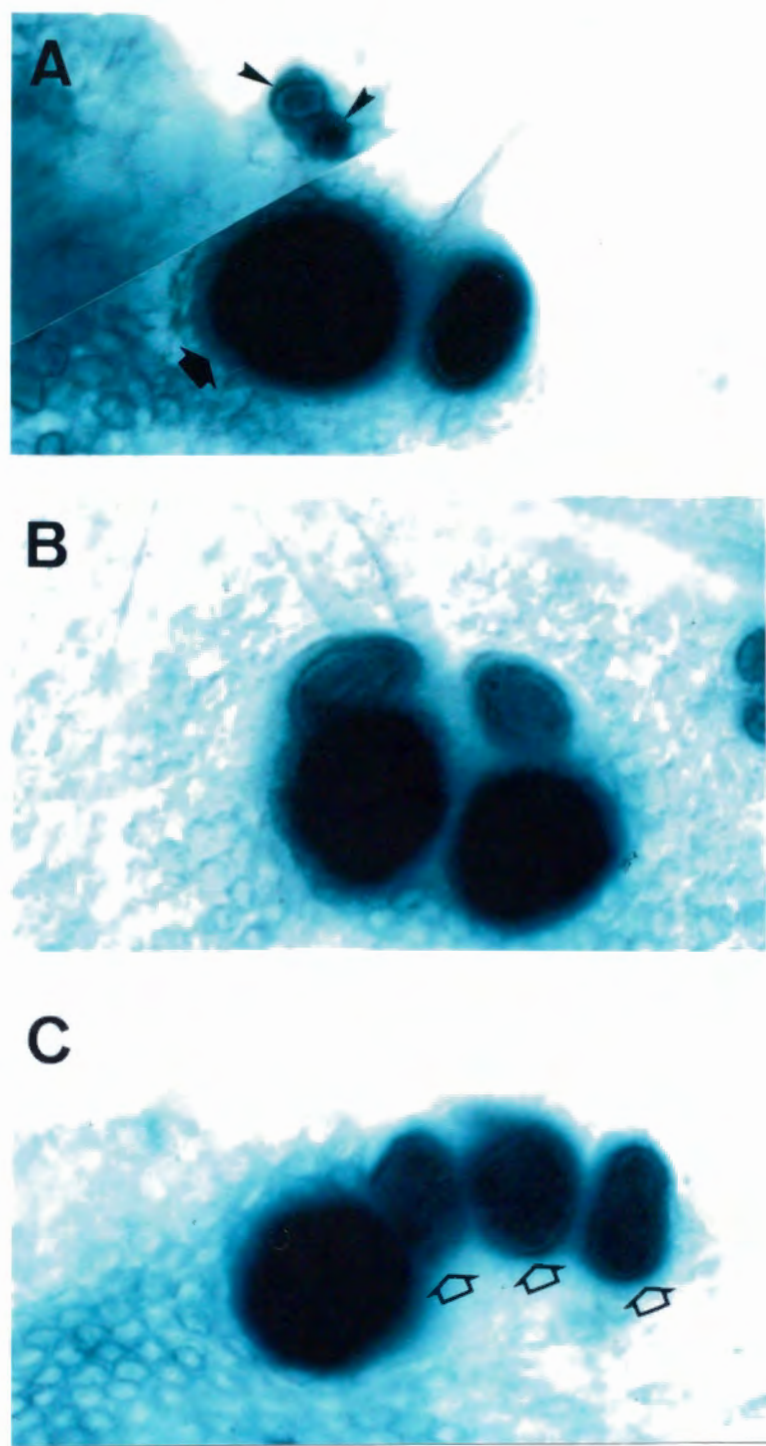


図 3-9 tws^{55} の感覚器の細胞構成 (2)

(A) B52 マーカーを用いた野生株のマクロキーテの染色像。小さい神経細胞と鞘細胞が付随している (矢じり)。シャフト細胞の核 (矢印) は他の 3 つの細胞の核よりも大きく、そして強く染色される。

(B) tws ホモ接合体に見られる重複した剛毛 (twins bristles)。ソケットとシャフト細胞がそれぞれ 2 個ずつある。

(C) tws ヘミ接合体 (tws^{55}/Df) に見られる異常な細胞構成。ソケット細胞が 3 個と (中抜き矢印)、シャフト細胞 1 個からなる。

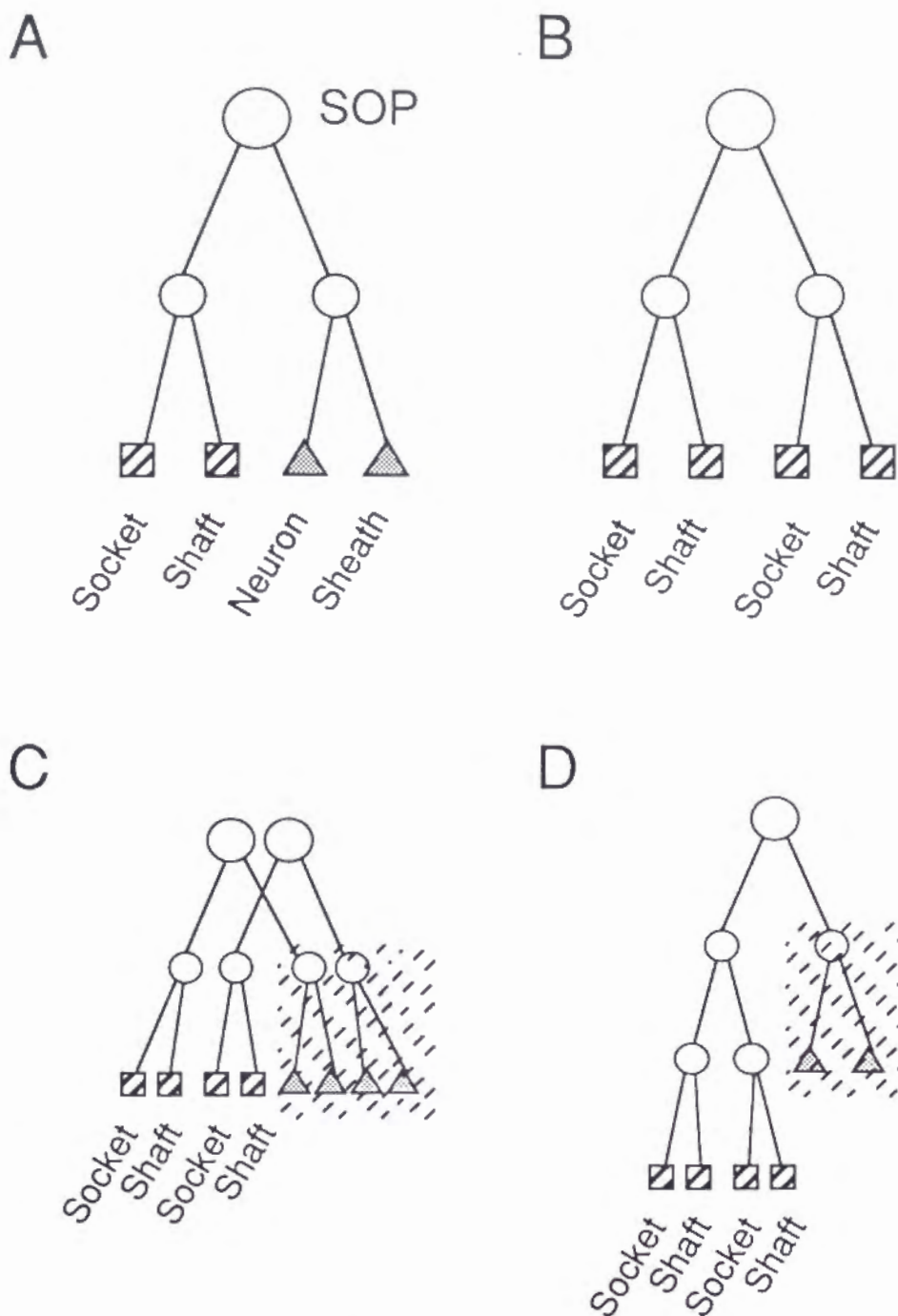


図 3-10 tws^{55} の表現型のモデル

(A) 野生株での機械刺激受容器官の細胞系譜。感覚器母細胞 (SOP) から、2つの2次前駆細胞ができる。その1つから神経細胞 (Neuron) と鞘細胞 (Sheath) が誕生し、もう1つからソケットとシャフトを形成する細胞が誕生する。

(B) tws^{55} ホモ接合体での細胞運命転換モデル (1)。神経細胞と鞘細胞が、ソケットとシャフトに運命転換する。

(C) モデル (2)。感覚母細胞が余分に誕生して、かつ神経細胞と鞘細胞が細胞死を起こす場合。

(D) モデル (3)。細胞死等が生じるモデル。2次前駆細胞の細胞分裂の停止あるいは細胞死により、神経細胞、鞘細胞が形成されず、かつソケットとシャフト細胞の分裂が余計におきる。

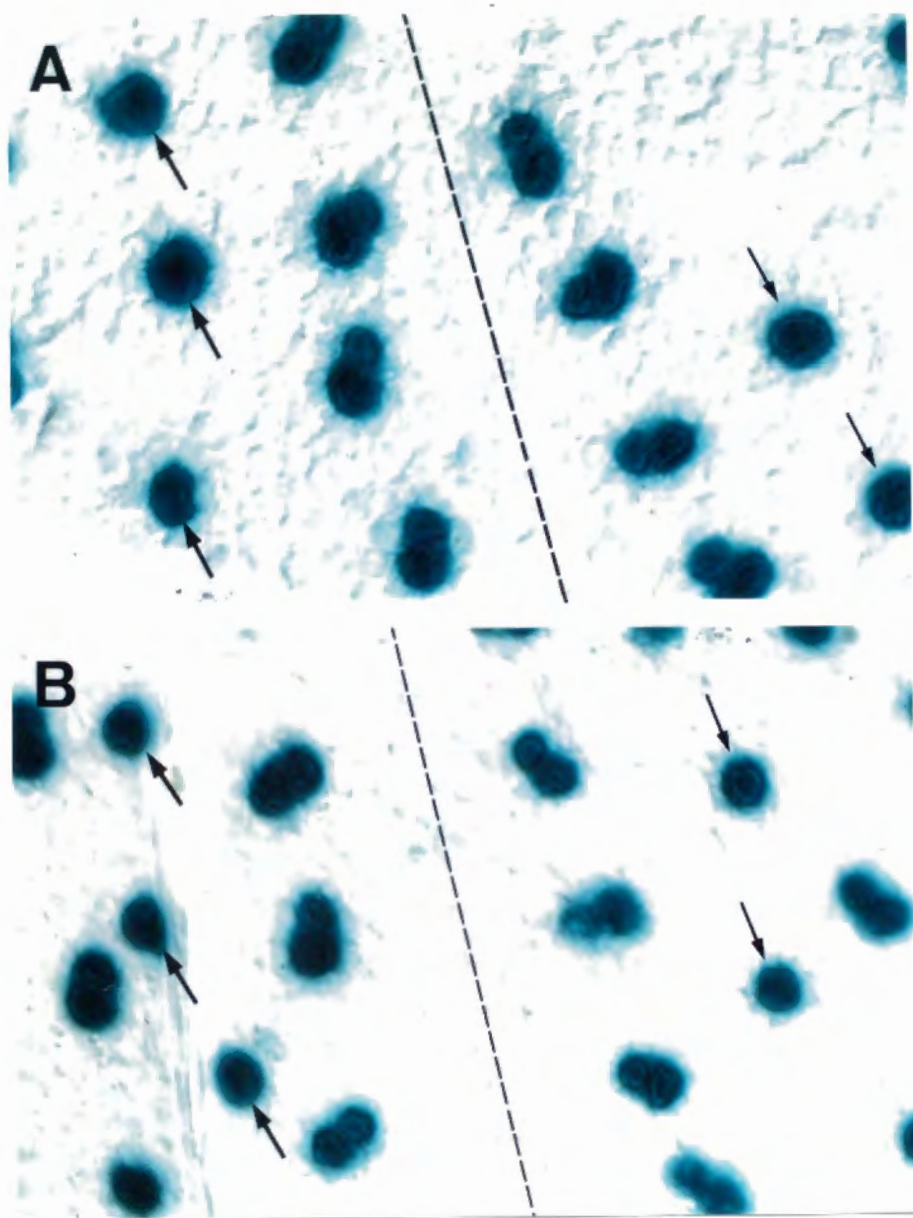


図 3-11 B52 マーカーによる細胞分裂の検証

(A) 野生株の胸部のマイクロキータの SOP の細胞分裂は、正中線に沿った列ごとに同調しておきる。点線は背側の正中線を示す。蛹化後約 16 時間では、正中線に最も近い感覚母細胞は 1 回目の分裂が終了している。2 列目の感覚母細胞の分裂の時期は、遅れている（矢印）。

(B) *tws⁵⁵* での分裂パターン。野生株と同様に列ごとに分裂が同調して起きている。

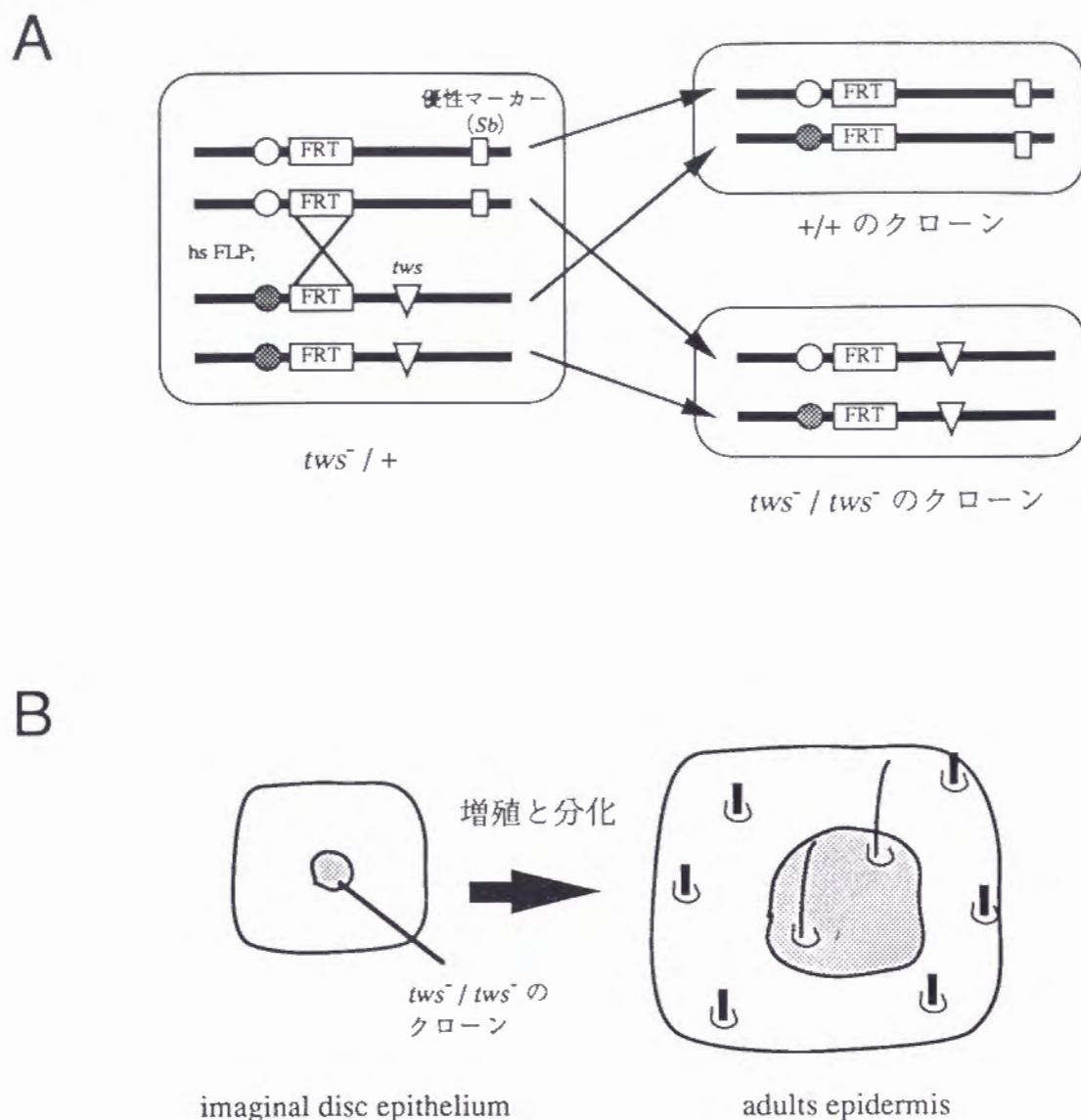


図 3-12 FLP/FRT システムを利用したモザイク解析

(A) FLP/FRT システムを用いて有糸分裂組換えを起こさせる方法の概略 (Xu and Rubin, 1993)。FLP は酵母の組換え酵素で、特異的な配列 (FRT) に結合して組換えを起こす。ヒートショックにより組換え酵素が発現すると (hsFLP)、FRT の部分で組換えが起きて、 tws^- / tws^- のクローンができる。優性マーカーとして剛毛が太く短くなる *Stubble* (Sb) を用いた (B と図 3-13 を参照)。

(B) 幼虫の成虫原基細胞で組換えを起こさせ、 tws^- / tws^- のクローンを作り、成虫でそのパッチ内の剛毛の形態を観察する。 tws^- / tws^- のクローンは、細長い剛毛をつくるので見分けることが出来る。

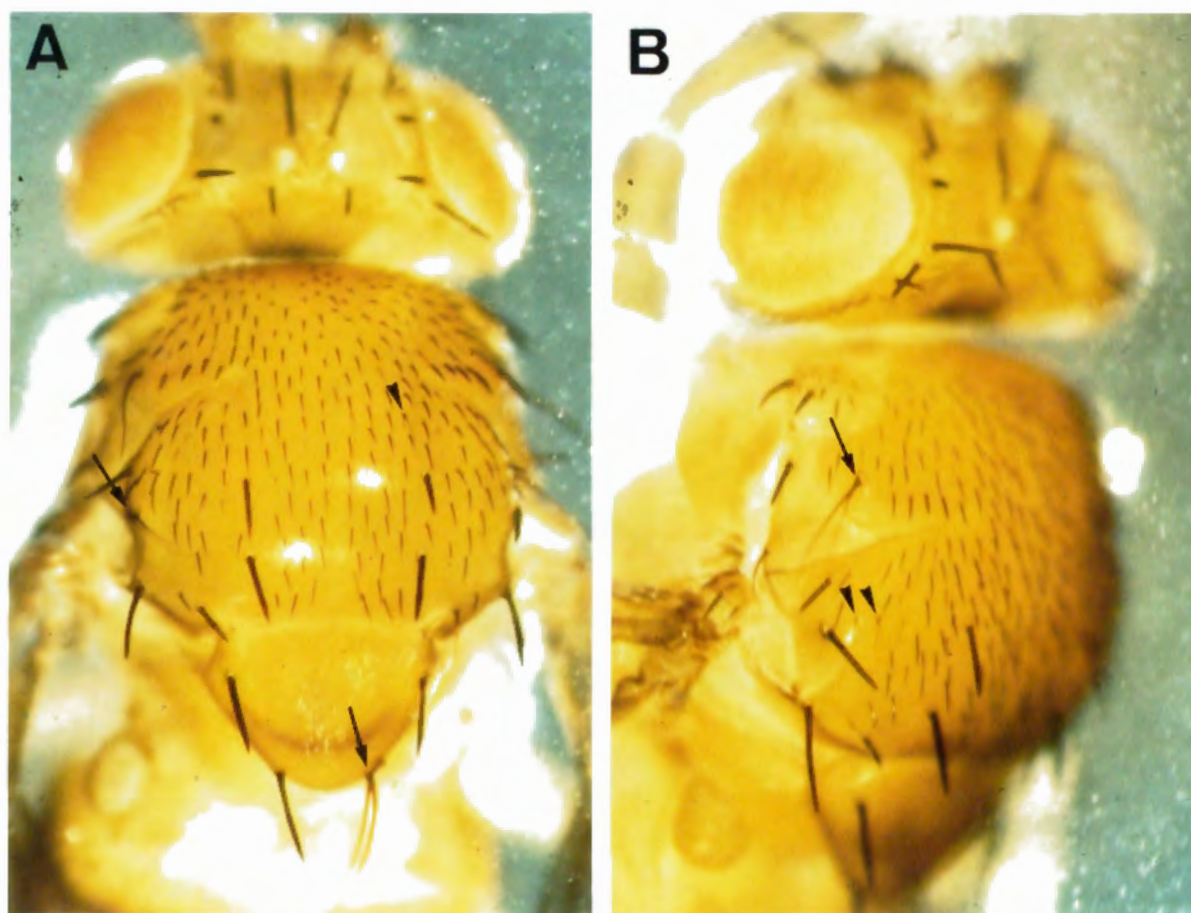


図 3-13 tws^{-}/tws^{-} のクローン内での剛毛の重複

2 齢幼虫の時期に有糸分裂組換えを起こさせた成虫。 tws^{-}/tws^{-} の細胞がつくった感覚器では剛毛が重複している（矢印のマクロキーテ）。マイクロキーテの重複も観察できるが、クローンのサイズは小さい（矢じり）。

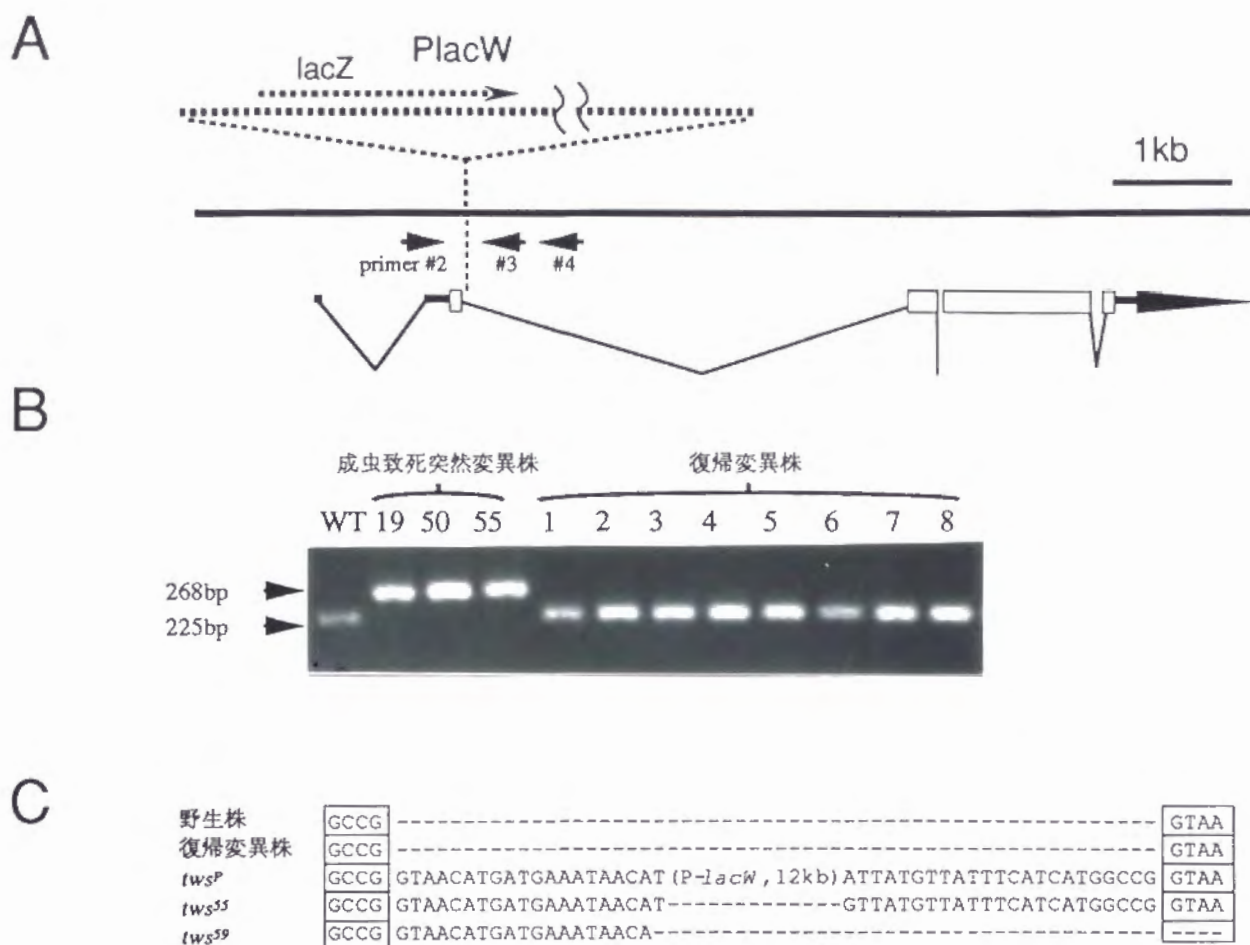


図 3-14 PCR によるゲノム構造の解析

(A) *tw^s* のゲノム構造および用いたプライマーの位置を示した図。P エレメントは第 2 イントロンの内側に挿入していた。プライマー #2 は挿入地点より 80 塩基対上流、#3 は 145 塩基対、#4 は 420 塩基対下流にある。

(B) プライマー #2 と #3 を用いた PCR により増幅されたゲノム DNA 断片。成虫致死変異株 (*tw^s*⁵⁵ 他) では野生株より長い断片が増幅された。復帰変異株 (1~8) では、野生株と同じ長さの断片が増幅された。*tw^s*⁵⁹ のゲノムではプライマー #3 がハイブリダイゼーションする領域が欠失しており、増幅されなかった (本文参照)。

(C) P エレメントの挿入部位付近のゲノム DNA の塩基配列。*tw^s*⁵⁵ では P エレメントの両端の配列 (左右あわせて 43 塩基対) を残して、P-lacW がジャンプアウトしたことがわかった。図の枠はゲノム DNA の部分であることを示す。*tw^s*⁵⁹ では挿入地点より下流のイントロンが 250 塩基対欠失していた。

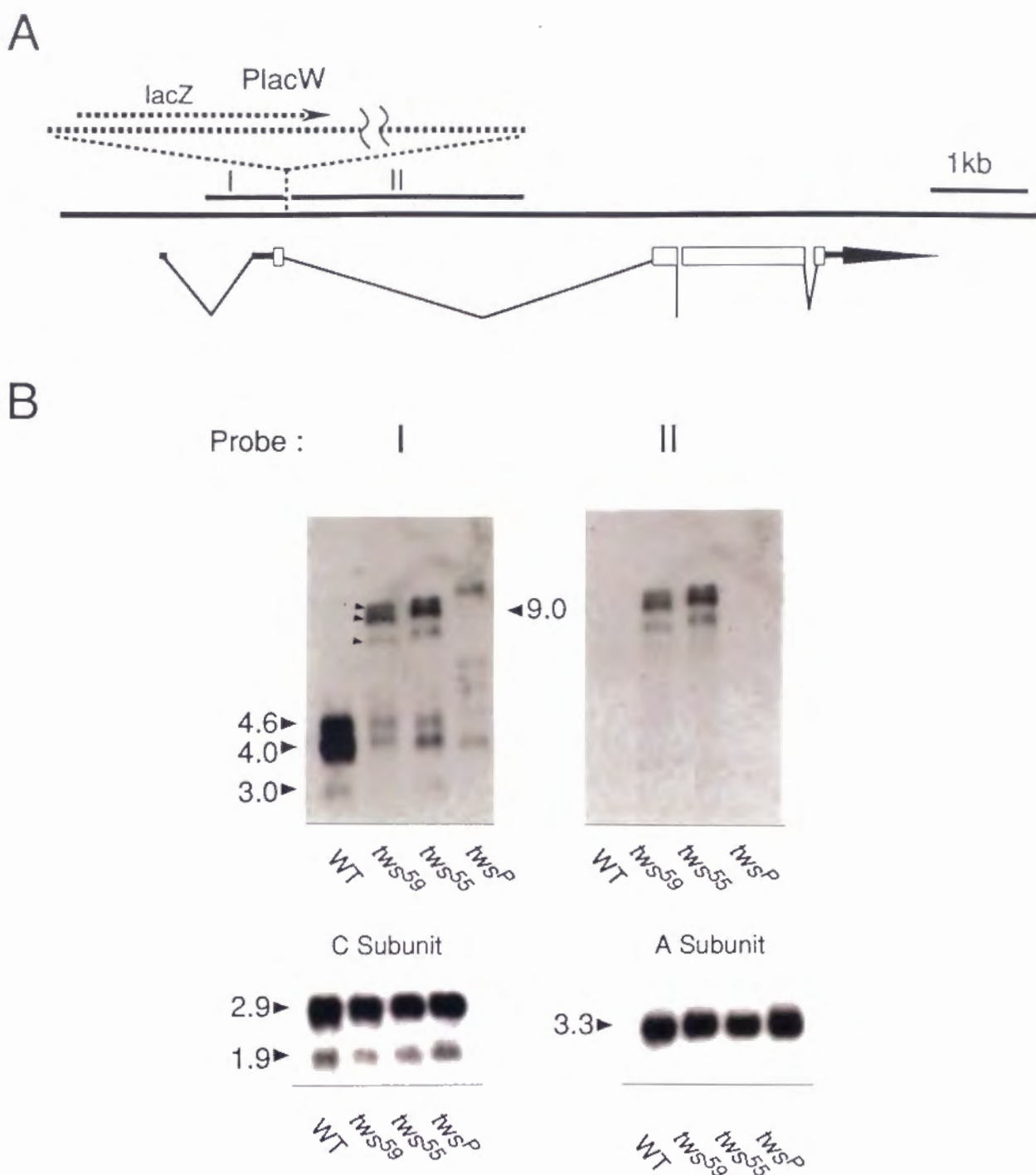


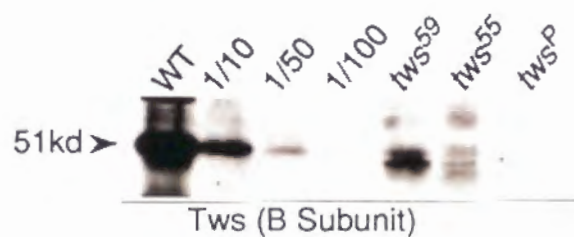
図 3-15 ノザンプロット解析

(A) *tws* 遺伝子のエクソン/イントロン構造とノザンプロットに用いたプローブ。プローブ II はイントロンの DNA 断片を用いた。

(B) 野生株では、3.0kb、4.0kb、4.6kb の 3 本のバンドが認識される。成虫致死変異株 (*tws*⁵⁵ と *tws*⁵⁹) ではプローブ II で認識される mRNA 前駆体 (9.0kb 前後、矢じり) が蓄積していた。*tws*^P は *lacZ* との融合転写物をつくっている (プローブ I、図 2-7 (B))。A サブユニットまたは C サブユニット

遺伝子のメッセージの量は、野生株と変異株で差はなかった。

A



B

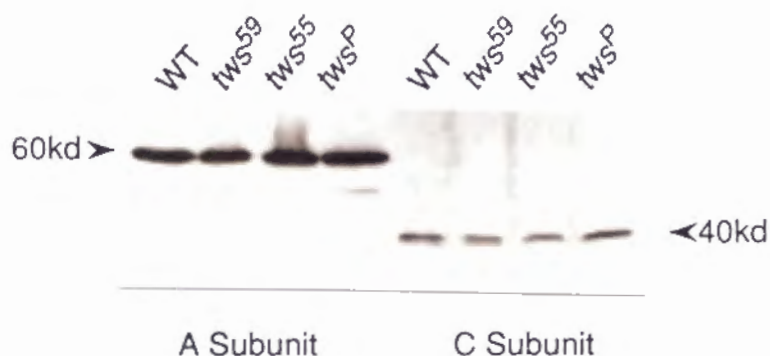


図 3-16 2A 型プロテインフォスファターゼの各サブユニットの存在量

(A) 野生株から抽出した蛋白質の希釈シリーズ (WT、1/10、1/50、1/100) と各変異株から抽出した蛋白質をプロットし、Tws (B サブユニット) に対する抗体で反応させた。*tws*^P では Tws 蛋白質は検出できない。*tws*⁵⁵ では 2%、*tws*⁵⁹ では 10% 程度まで減少している。

(B) A サブユニットや、C サブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロット。他のサブユニットは野生株と変異株とで差はない。

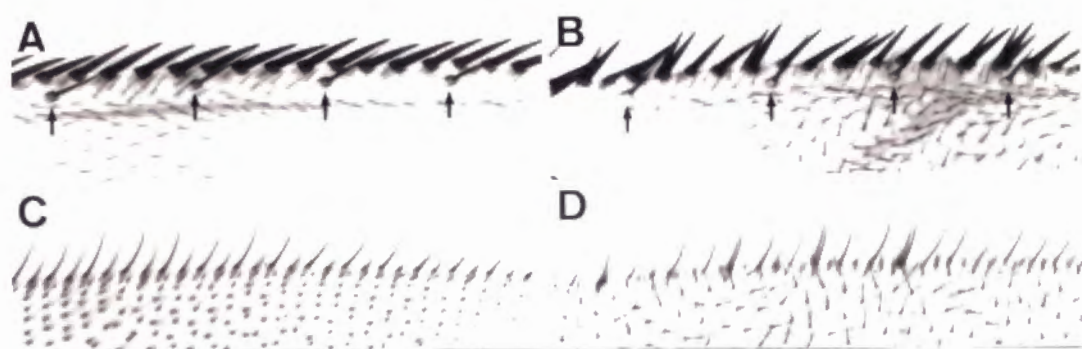


図 3-17 羽の縁 (wing margin) の感覚器

(A) 野生株の羽の前側の縁にある感覚器。化学刺激を検知する剛毛は2列目に存在し(矢印)、機械刺激受容器官の剛毛より細い。

(B) *tws⁵⁵* 変異株では、機械刺激受容器官の剛毛は重複を起こすが、化学刺激受容器官では重複は起きない。

(C) 野生株の羽の後ろ側の縁には、長い毛がある。これらは神経細胞の支配を受けていない。

(D) *tws⁵⁵* 変異株では、この毛でも重複がおきる。

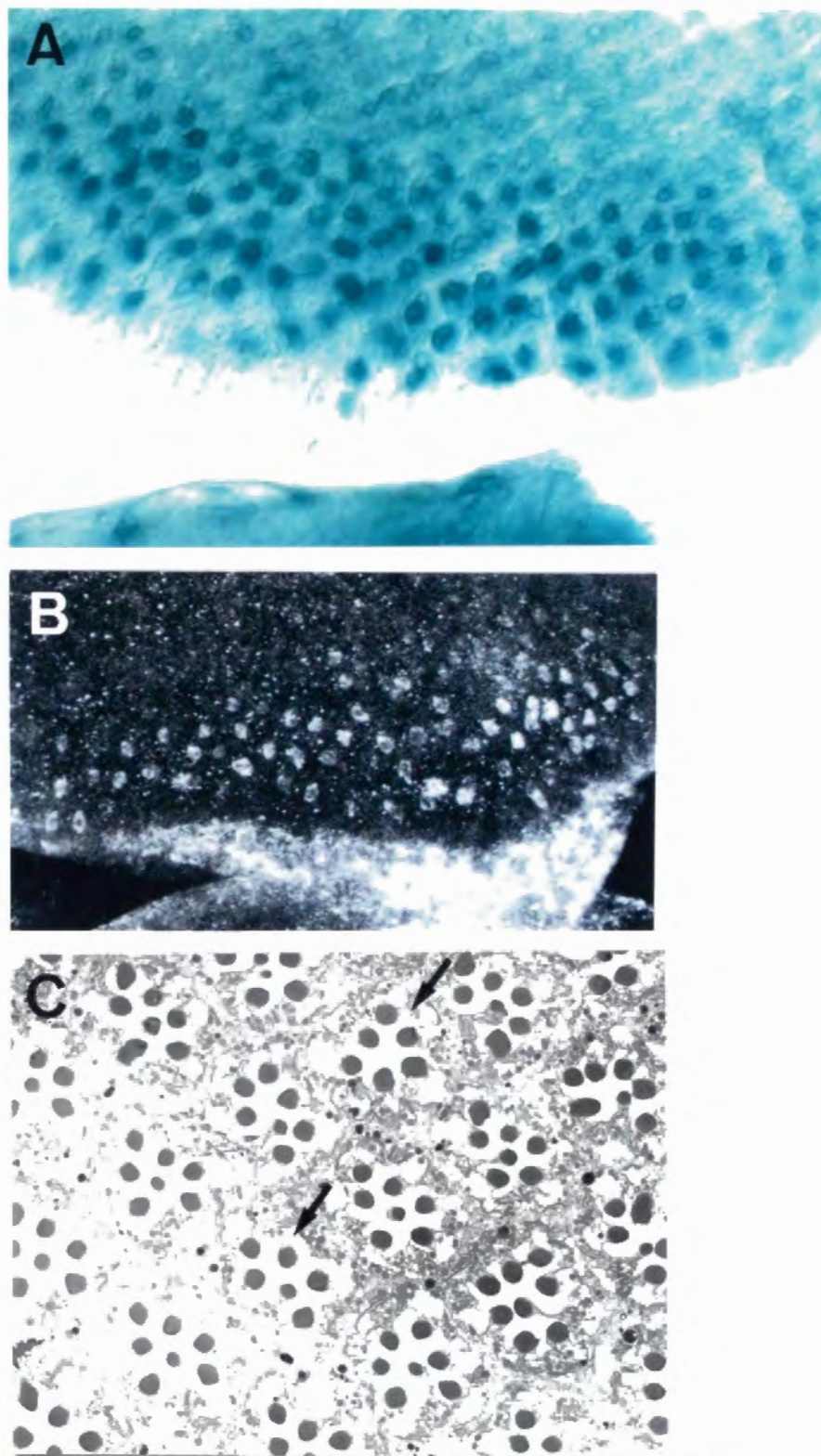


図 3-18 複眼における *tws* 変異の影響

(A) XA12 マーカーによる複眼原基の X-gal 染色像 (*tws*⁶⁰)。光受容細胞の中の 7 番目の細胞 (R7) が染色されている。

(B) 抗ベータガラクトシダーゼ抗体による染色像。R7 に対応するシグナルがほとんどの個眼に 1 つずつ存在する。

(C) 電子顕微鏡による *tws*⁵⁵ 成虫の複眼の解析。8 % の個眼で光受容細胞の数が 1 つ減少している事が判明した (矢印)。但し R7 よりも R1 から R6 のいずれかが無くなっている例が大半だった (下の矢印)。この電子顕微鏡写真は愛知ガンセンターの西義美先生と名古屋大学の西田育巧先生の協力により撮影された。

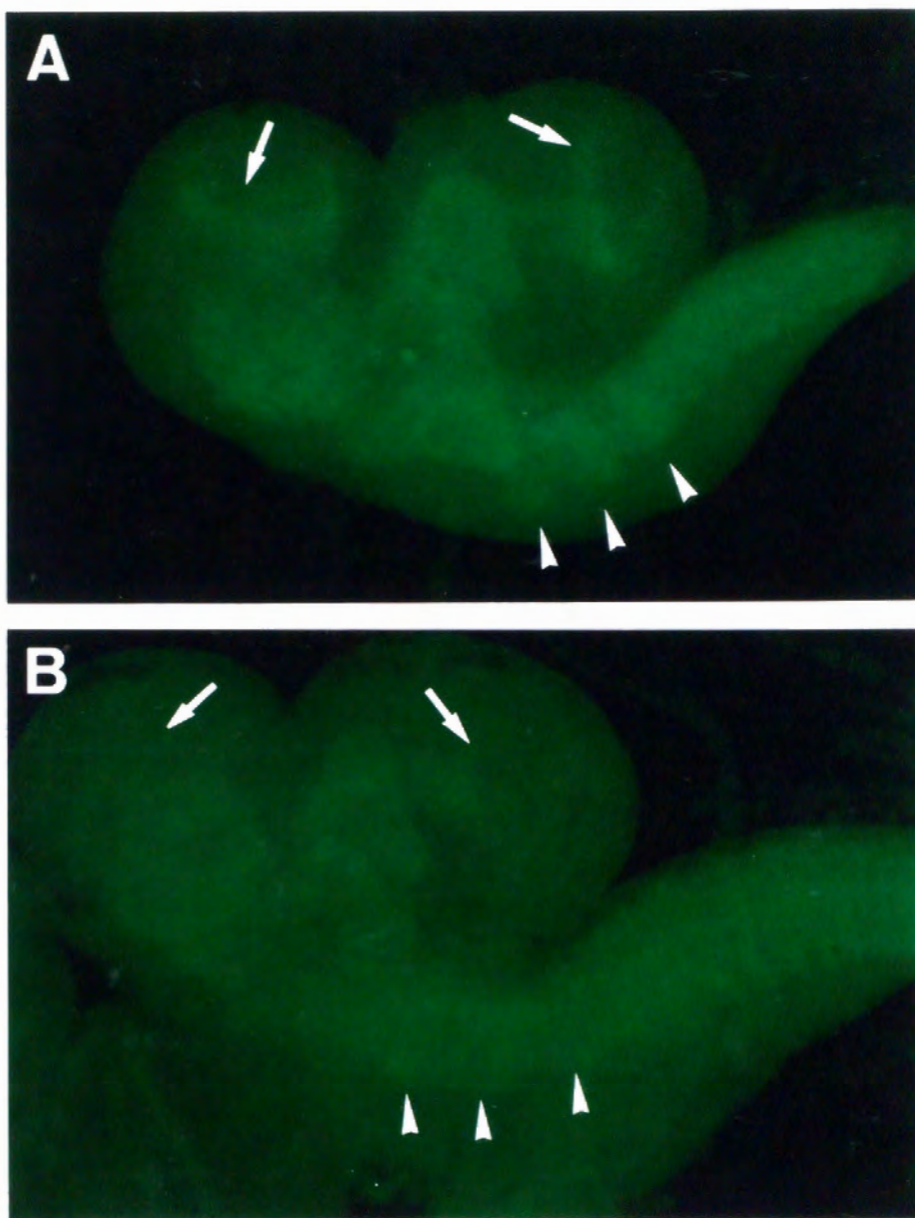


図 3-19 tws^P の中枢神経系における形成不全

抗 α カテニン抗体による 3 齢幼虫の中枢神経系の染色像、神経軸索が染色される。

(A) 野生株の染色像。三日月状の optic lobe neuropile (矢印) と胸部に 3 対の神経節 (矢じり) が観察できる。

(B) tws^P ホモ接合体ではそのいずれも形成が不完全である。

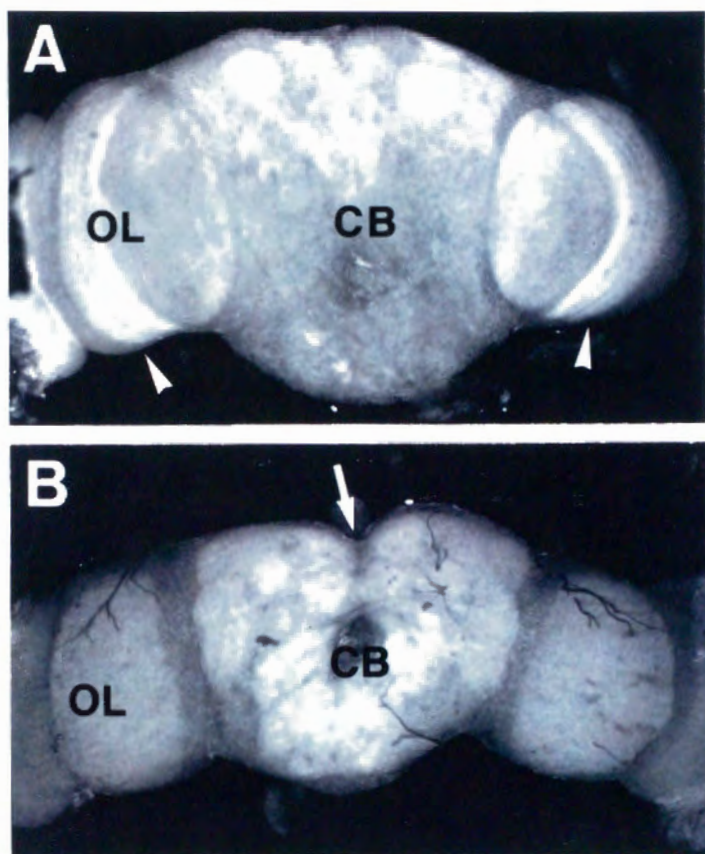


図 3-20 成虫の脳のホルマウント像

- (A) 野生株の成虫の脳の正面像（自家蛍光）。上が背、下が腹側。視葉（optic lobe、OL）の層構造（矢じり）が観察できる。
- (B) *tws⁵⁵* の脳。層構造の形成がされていない。また、Central brain (CB) のサイズも野生株より小さい（矢印）。

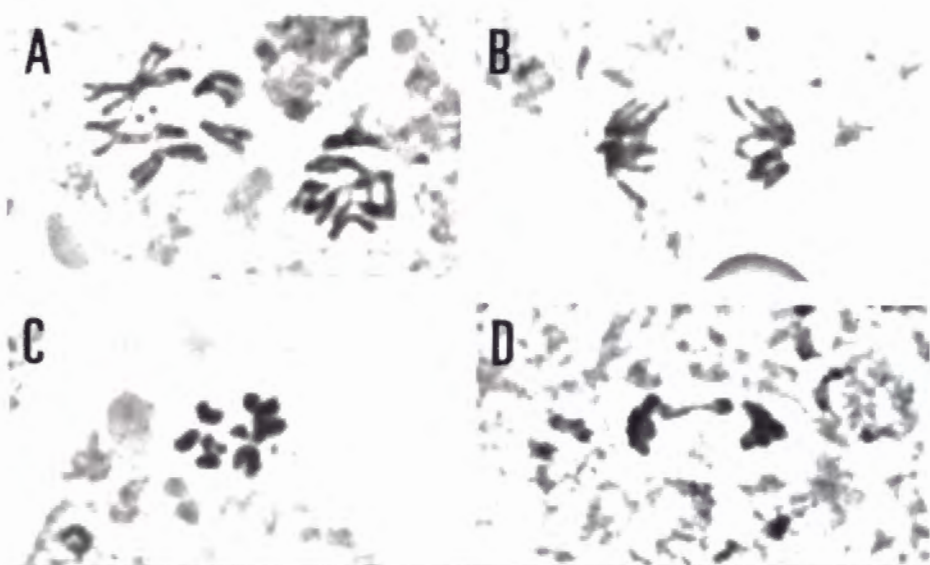


図 3-21 tws^P の脳の異常な有糸分裂像

(A、B) 3 齢幼虫の神経母細胞 (neuroblast) の細胞分裂像 (野生株)。

(C、D) tws^P ホモ接合体での異常。染色体の著しい過凝縮 (C) と染色体の分離異常 (D) が観察できる。

(A)と(C)はmetaphase、(B)と(D)はanaphaseである。

tws^{55} でも (C) と (D) のような分裂像が観察できた。

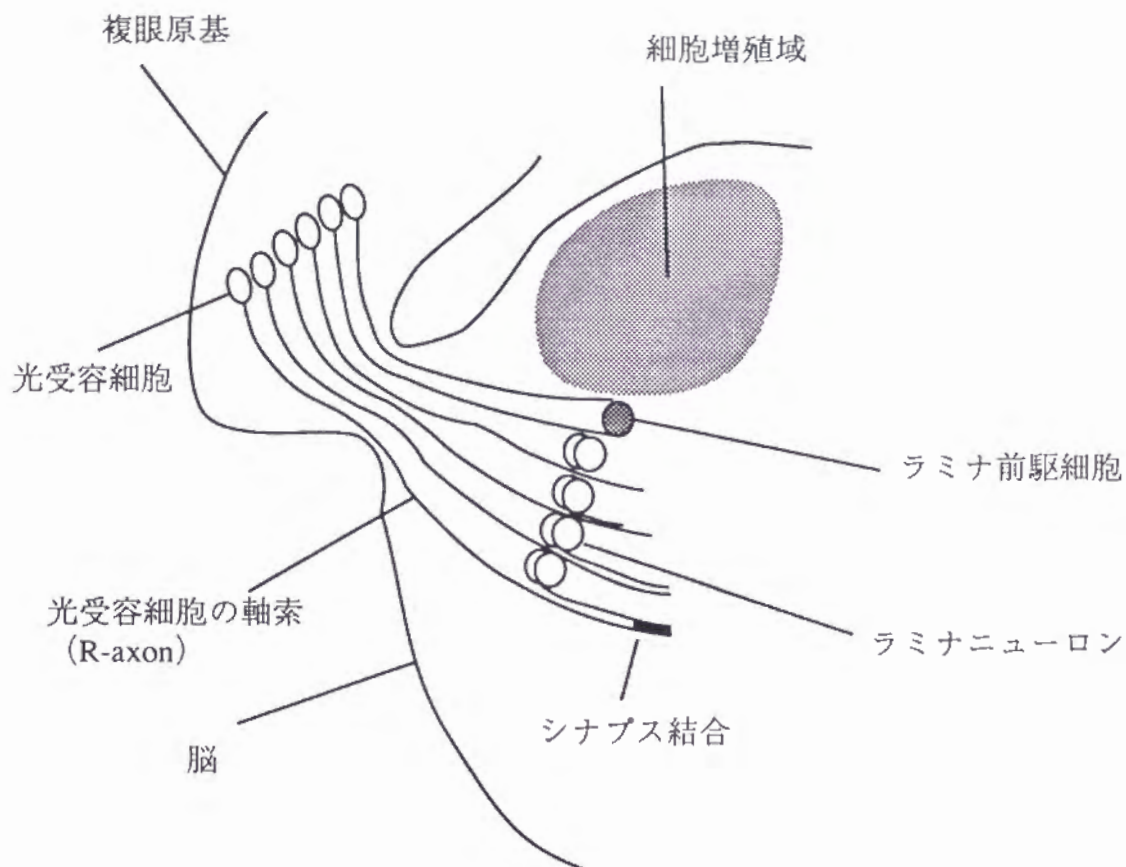


図 3-22 複眼原基からの神経投射と脳内の細胞分裂

複眼原基の光受容細胞は軸索 (R-axon) を脳内の視葉 (optic lobe) に投射する。optic lobe 内のラミナ前駆細胞は、恐らくその軸索と接することによりシグナルを受け取り分裂する。誕生した細胞はラミナニューロンに分化し、R-axon との間にシナプス結合をつくる。

Banerjee and Zipursky (1990) の図を改変した。

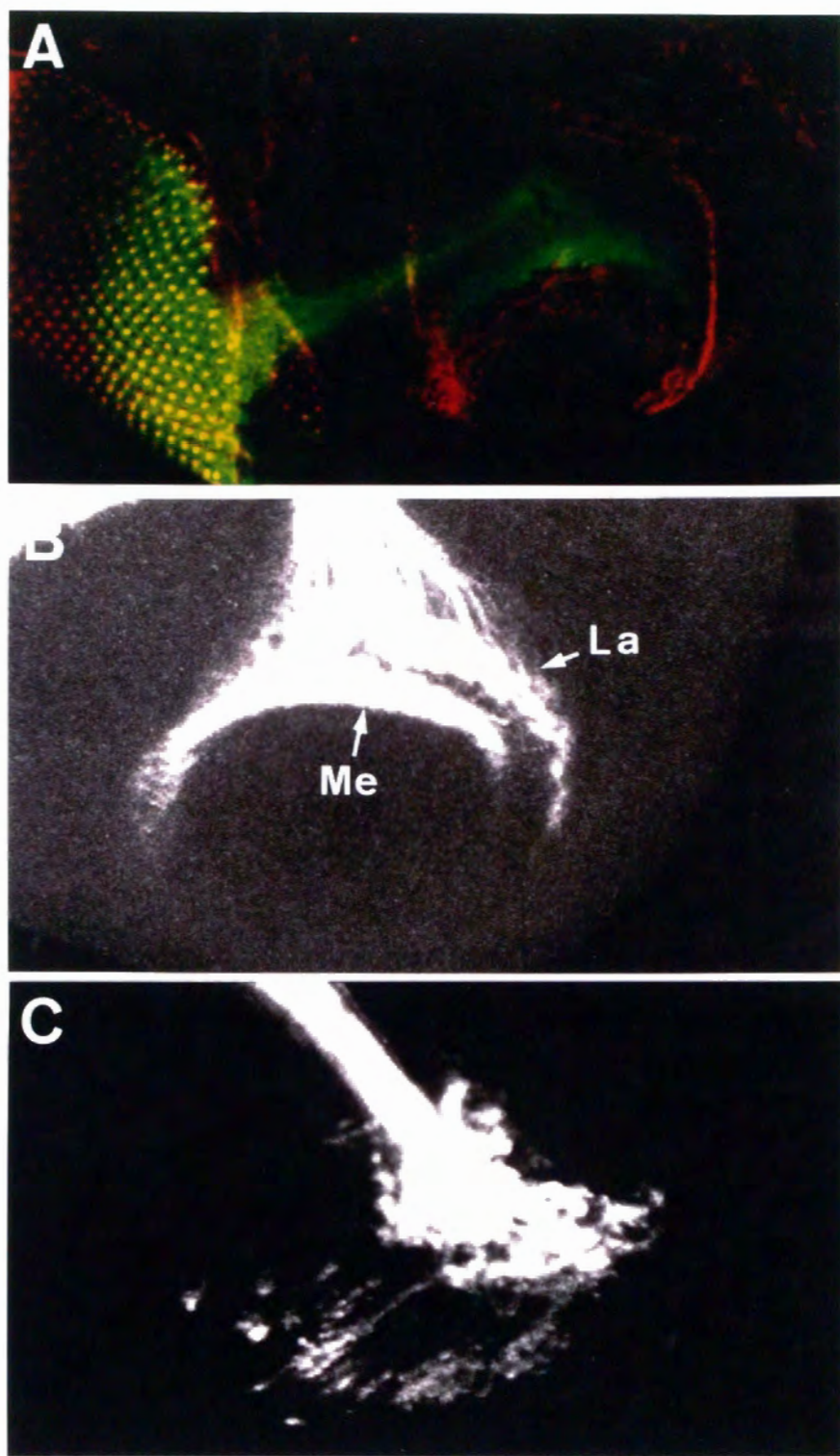


図 3-23 光受容細胞の軸索の投射パターン

(A) 野生株の3齢幼虫の複眼原基と脳を24B10(緑)とDCAD2(赤)により2重染色した像。左側の複眼原基から右側の視葉(optic lobe)へ軸索(緑)が伸長している。

(B) 野生株の投射パターン。optic lobe内で三日月上に軸策が広がっている。軸索の終末はラミナ(La)とより深い位置のメダラ(Me)の2層に別れている。

(C) *tws^P*での異常な投射パターン。軸策が広がらず、乱れている。

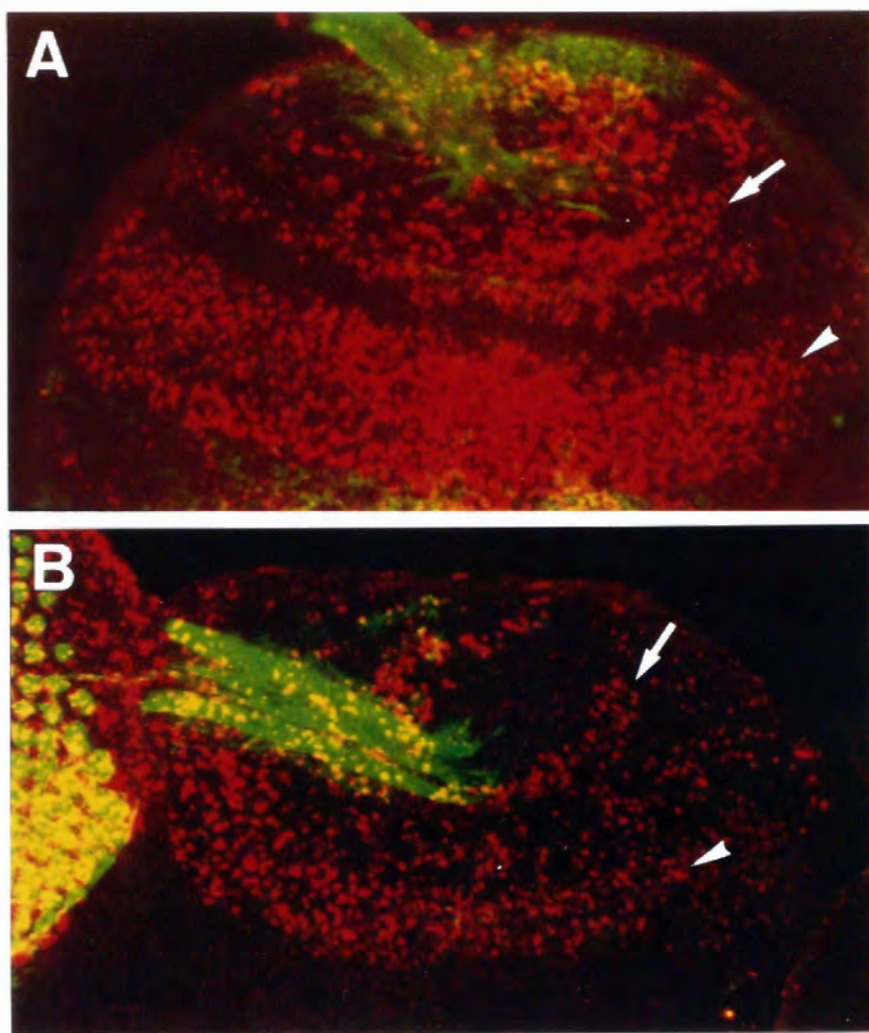


図 3-24 神経の投射と視葉 (optic lobe) のプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みパターン

α BrdU (赤) と神経軸索マーカー (α HRP、緑) で 2 重染色したコンフォーカル顕微鏡写真。

(A) 野生株の 3 齢幼虫の optic lobe の染色像。ラミナ前駆体細胞の増殖域 (矢じり) と軸索が到達した場所 (矢印) の 2 ヶ所で、取り込みが確認できる。

(B) *tws^P* での染色像。BrdU を取り込んだ細胞の数は減少しているが、軸索と接する領域でもシグナルは検出できる (矢印)。

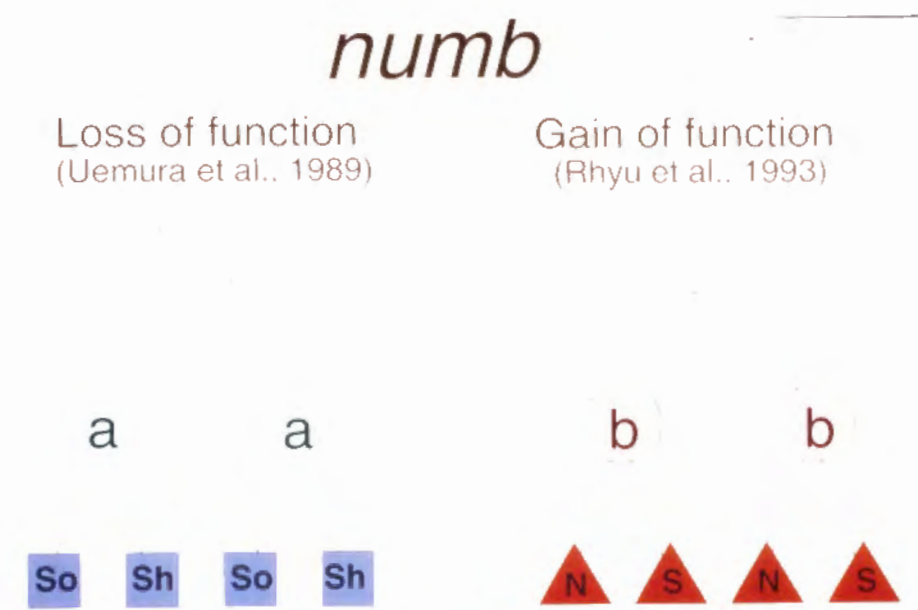


図 3-25 *numb* の表現型

numb の Loss of function mutation (機能喪失変異) では、2 次前駆細胞がどちらも支持細胞を形成する a cell になってしまい、ソケット細胞 (So) とシャフト細胞 (Sh) が 2 組形成される。逆に Gain of function mutation (2 次前駆細胞の両方で Numb を強制発現させた場合) は、神経細胞 (N) と鞘細胞 (S) が重複する。

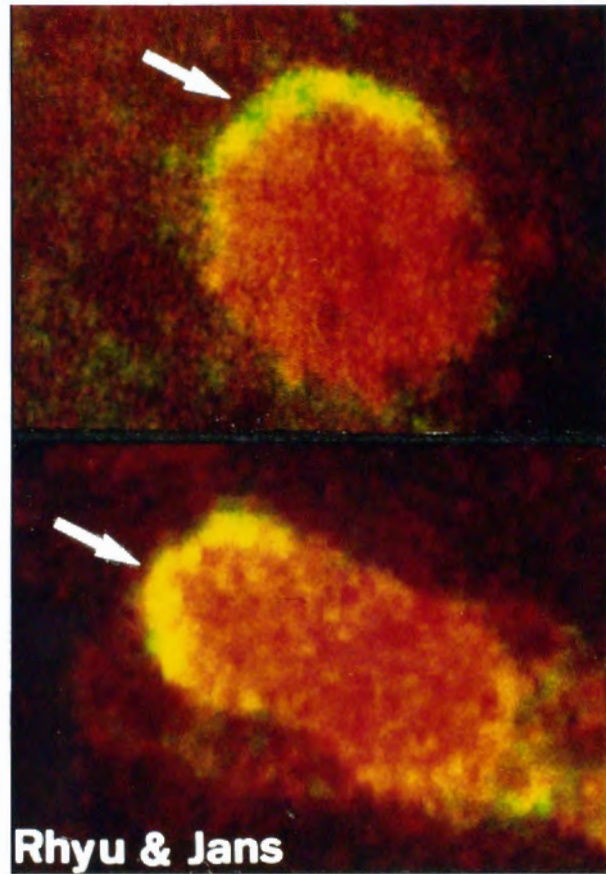


図 3-26 Numb 蛋白質の娘細胞への不均等な分配

感覚器母細胞（赤色）の分裂時における Numb 蛋白質の局在（黄色、矢印）。Numb は分裂直前の母細胞の片側に偏って分布し、一方の娘細胞のみに分配される（Rhyu et al., 1994 の図を改変）。

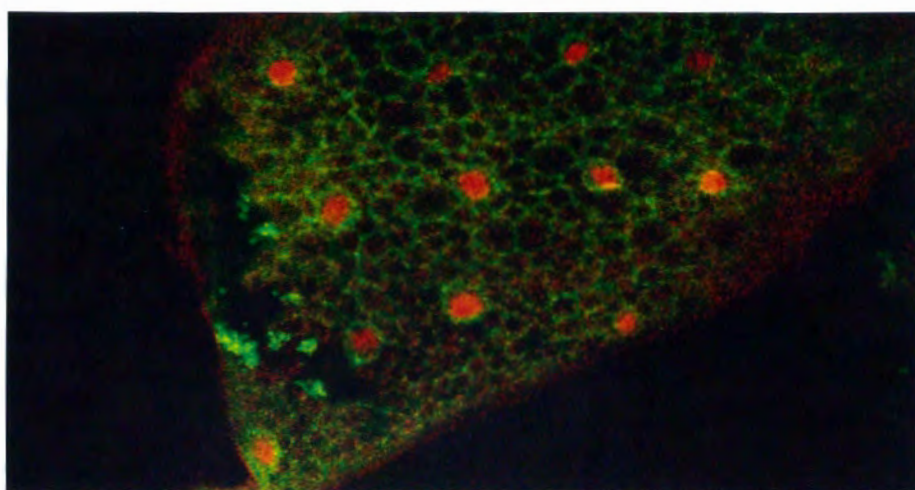


図 3-27 *tw55* での Numb 蛋白質

B52*tw55* の蛹期の Notum を抗 Numb 抗体で染色した（緑）。同時に抗 β ガラクトシダーゼ抗体により染色してあり、マイクロキーテの感覚器母細胞の核が赤く染色されている。

tw55 でも、野生株（データは示していない）でも、我々の実験条件下では、上皮細胞の境界が強く検出され、Numb の感覚器母細胞での局在したシグナル（図 3-26）を確認できなかった。

hPR55α	MAGAGGGNDIQWCFSSQVKGAVDDDDVAEADIISTVEFNHSGELLATGDKGGRVVIFQOEQE	60
	primer #9	
hPR55β	MEEDIDTRKINNSFLRDHSYATEADIISTVEFNHTGELLATGDKGGRVVIFQREQE	56
	primer #10	
twins	MAGNGEASWCFSQIKGALDDVDTDADIISCVFNHSGELLATGDKGGRVVIFQORDPA	57
CDC55	MAQNNFDFKFSQCFGDKADIVVTEADLITAVEFDYTGNYLATGDKGGRVVLFERSNS	57
hPR55α	NKIQSHSRGEYNVYSTFQSHEPEFDYLSLEIEEKINKIRWLPQKNAAQFLLSTNDKTIK	120
hPR55β	SKNQVHRRGEYNVYSTFQSHEPEFDYLSLEIEEKINKIRWLPQKNAAQFLLSTNDKTVK	116
twins	SKAANPRRGEYNVYSTFQSHEPEFDYLSLEIEEKINKIRWLPQKNPVHFLSTNDKTVK	117
CDC55	-----RHCEYKFLTEFQSHDAEFDYLSLEIEEKINEIKWLRPTQRSHFLLSTNDKTIK	111
	primer #11	
hPR55α	LWKISERDKRPEGYNLKEED-----GRYRDPPTTVTTERVPVFRPMDLMV	164
hPR55β	LWKVSEDRKPEGYNLKEE-----GRLRDPATITTLRVPVLRPMDLMV	160
twins	LWKVSEDRKSGGYNTKEEN-----GLIRDPQNVTLRVPVSVKQIPLLV	161
CDC55	LWKVVEKNIKLVSONNLTEGVTFAKKGKPDNHNRCSSVRAVLSQLSLKLPQLSQHDKII	171
hPR55α	EASPRRIFANAHTYHINSISINSYETILSADDLRINLWHLITDRSFNIVDIKIPANMEE	224
hPR55β	EATPRRVFANAHTYHINSISVNSDYETIMSADDLRINLWNFEITNQSFNIVDIKIPANMEE	220
twins	EASPRRTFANAHTYHINSISVNSDQETFLSADDLRINLWHLVVNQSFNIVDIKIPANMEE	221
CDC55	AATPKRIYSNAHTYHINSISLNSDQETFLSADDLRINLWNLDIPDQSFNIVDIKIPANMEE	231
	primer #12	primer #14
hPR55α	LTEVITAAEFHPNSCNTFVYSSSKGTIRLCDMRASALCDRHSKLFEEPEDPSNRSFFSEI	284
hPR55β	LTEVITAAEFHPHCNTFVYSSSKGTIRLCDMRASALCDRHKFFEEPEDPSNRSFFSEI	280
twins	LTEVITAAEFHPTECNFVYSSSKGTIRLCDMRSAALCDRHSKQFEEPEPNPTNRSFFSEI	281
CDC55	LTEVITSAEFHPQECNLFMYSSSKGTIKLCDMRQNSLCDNKTKTFEEYLDPIHNHFFTEI	291
	primer #13	
hPR55α	ISSISDVKFSHSGRYMMTRDYLTVKIWDNLNMRNPVETVQVHEYLRSKLCSLYENDCIFD	344
hPR55β	ISSISDVKFSHSGRYIMTRDYLTVKVDNLNMRNPVETVQVHDYLRSLKLCSLYENDCIFD	340
twins	ISSISDVKLSNSGRYMSRDYLSIKVWDLHMETKPIETVPVHEYLRAKLCSLYENDCIFD	341
CDC55	TSSISDIKFSPNGRYIASRDYLTVKIWDVNMNDKPLKTIINIHEQLKERLSDTYENDAIED	351
		primer #15
hPR55α	KFECCWNGSDSVMTGSYNNFF-----	366
hPR55β	KFECCVWNGSDSVIMTGSYNNFF-----	362
twins	KFECCWNGKDSIMTGSYNNFF-----	363
CDC55	KFEVNFSGDSSVMTGSYNNNEMIYPNVVTSGDNDNGIVKTFDEHNAFNSNSKNKIHNSI	411
	primer #16	
hPR55α	-----RMFDRNTKRDITLEASRENNKPR-----T	390
hPR55β	-----RMFDRNTKRDVTLASRENSKPR-----A	386
twins	-----RVFDRNSKKDVTLEASRDIIKPK-----T	387
CDC55	QNKDSSSSGNSHKRRSNGRNTGMVGSSNSSRSSIAGGEGANSEDSGTEMNEIVLQADKTA	471
hPR55α	VLKPRKVCASGKRKKDEISVDSLDFNKKILHTAWHPKENIIA VATTNLLYIFQDKVN	447
hPR55β	ILKPRKVCVGKKRRKDEISVDSLDFSKKILHTAWHPSENIIA VATTNLLYIFQDKVN	443
		primer #17
twins	VLKPRKVCTGGKRKKDEISVDCLDFNKKILHTAWHPKENIIA VATTNLLYIFQDKF	443
CDC55	FRNKRYGSLAQRSARNKDWGDDIDFKKNILHFSWHPRENSI A VATTNLLYIFPSAL	526

図 3-28 マウス B サブユニット遺伝子のクローン化に用いた PCR プライマー

B サブユニット間で保存されている領域を選びプライマーを作製した。マウス新生児及び、成体の脳由来の cDNA を鋳型にして PCR を行った。primer #12 と primer #16 とを用いた時に B サブユニットの DNA 断片が増幅された。

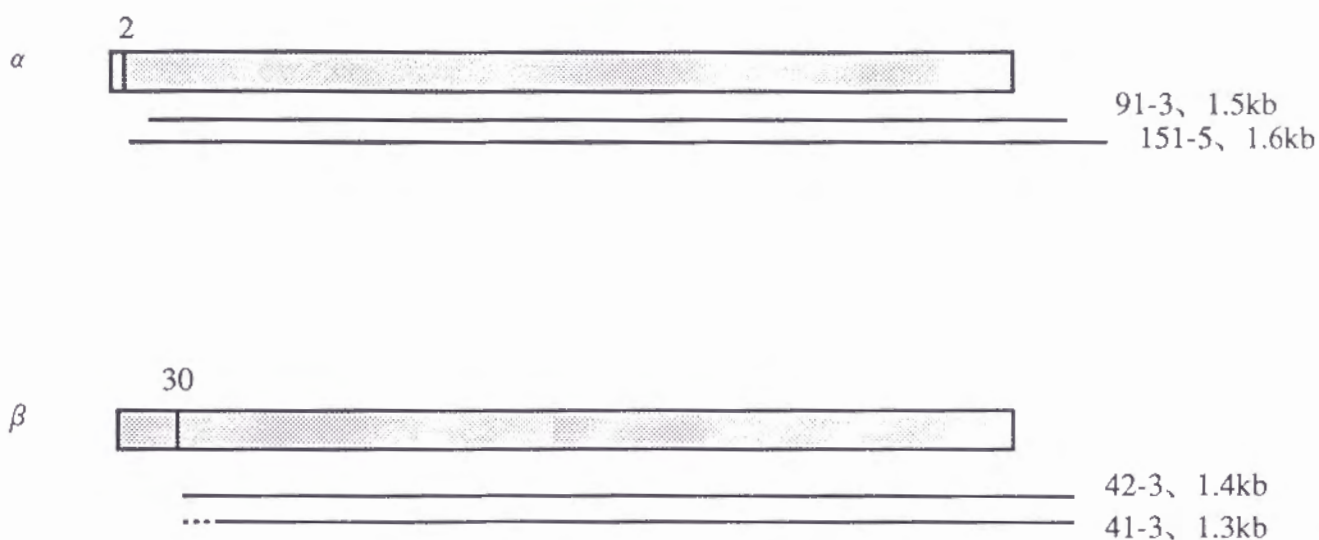


図 3-29 マウス *tws* ホモログのクローニング

PCR で得られた cDNA断片をプローブにして、cDNA ライブラリーをスクリーニングし、得られたクローン。ヒトの各 B サブユニットのアミノ酸配列と、得られたクローンの塩基配列から予想されるアミノ酸配列とを比較して、各クローンがどの部分に相当するかを配置した図である。 β はアミノ酸にして 30 番目以降、 α は 2 番目以降に相当する cDNA が得られていると考えられる。点線で示したクローン 41-3 の末端は、イントロンと思われる配列が存在していた。

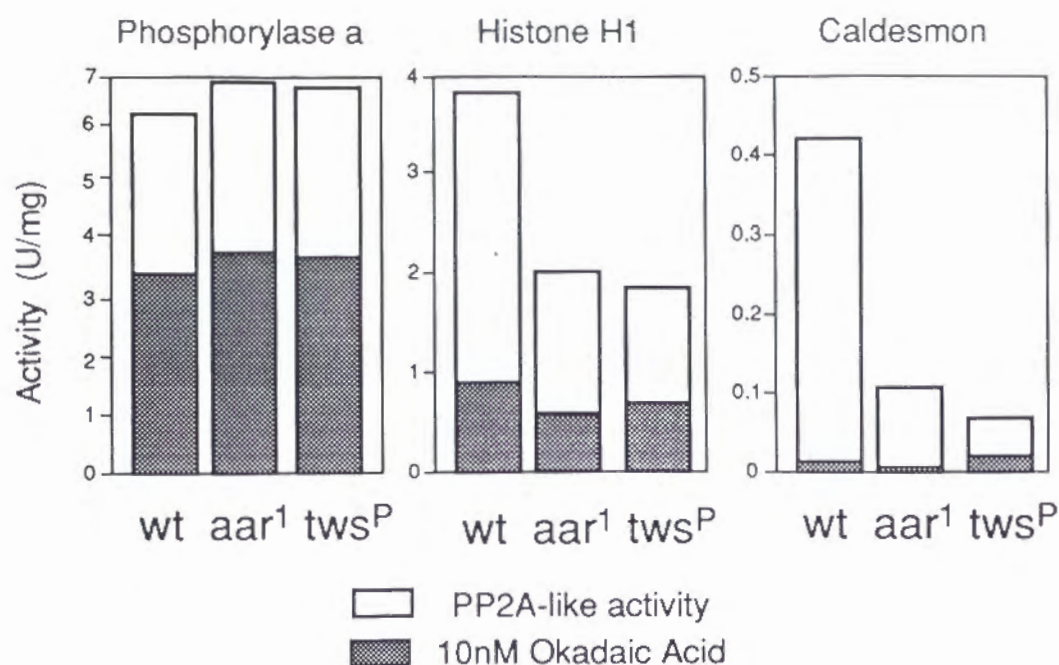


図 4-1 脳からの粗抽出液中のプロテインフォスファターゼ活性

野生株 (wt)、*aar1*、*tws^P* の 3 齢幼虫の脳の抽出液のプロテインフォスファターゼ活性を、阻害剤のオカダ酸 (Okadaic Acid) の存在下、または非存在下で測定した。PP 2A の活性は 10 nM のオカダ酸存在下で阻害されるが、PP 1 などの活性は阻害されない。よってグラフのバーの上部の白抜き部分が PP2A 様活性となる。Histon H1 や Caldesmon を基質とした時は、変異株での PP2A 様活性が低下している。

(Mayer-Jaekel et al., 1994)

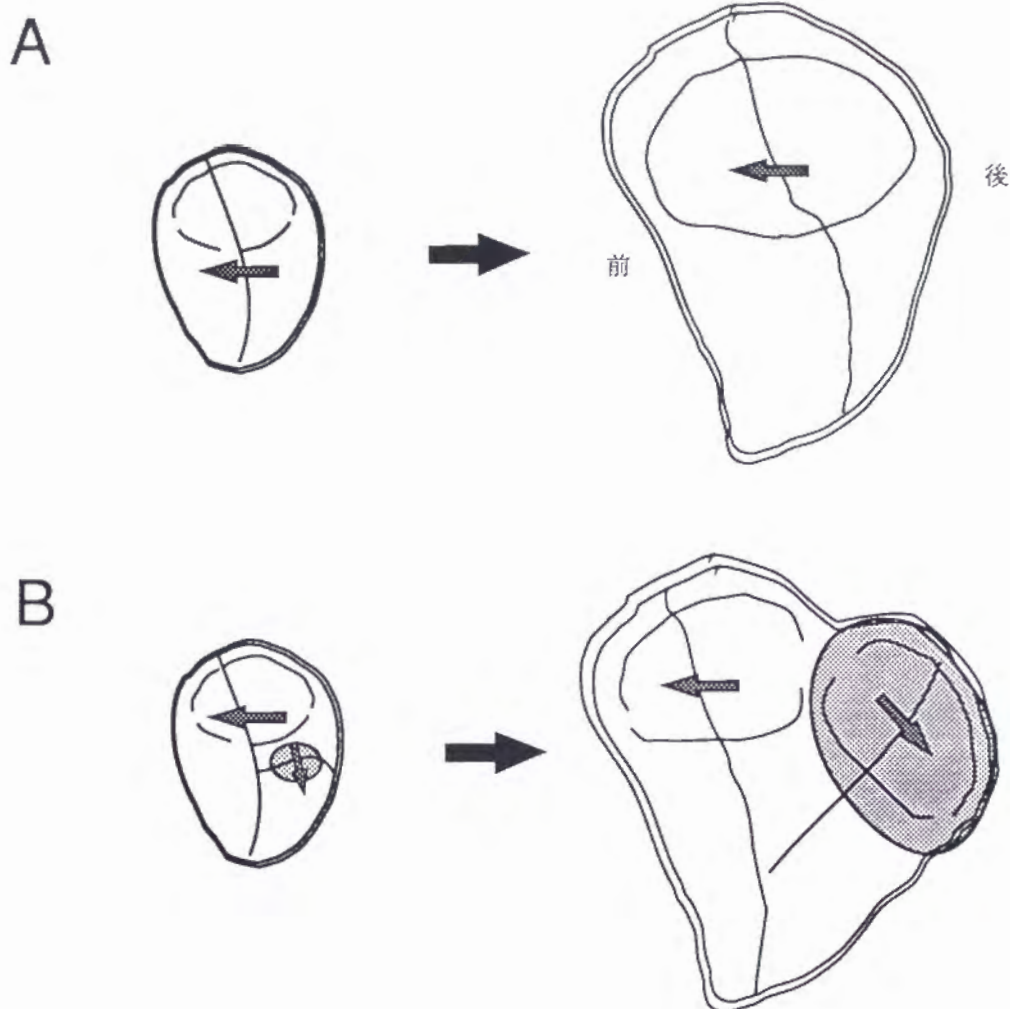
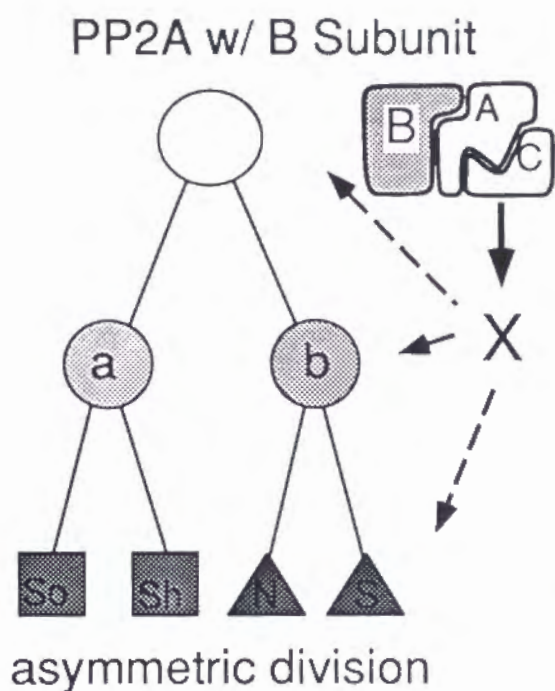


図 4-2 *tws^P* における運命転換とパターン重複

(A) 野生株の成虫原基は幼虫時に増殖し、前部区画と後部区画の間で、細胞間相互作用を行い、パターンを形成していく。

(B) *tws^P* では成虫原基の一部（影付けした部分）で運命転換がおこり、翅になる部分が重複する。

A



B

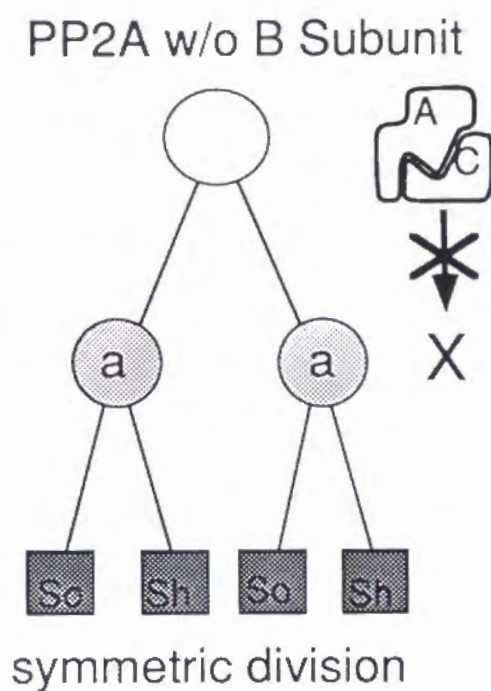
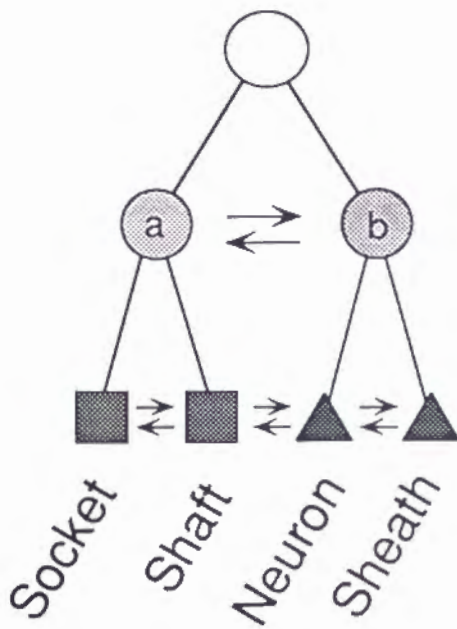


図 4-3 *tw55* での運命転換のモデル

(A) 非対称分裂 (asymmetric division) に必須な PP2A。PP2A は基質 X のリン酸化を調節して、X の機能をコントロールする。X は感覚器母細胞が分裂する時に機能して、a cell と b cell を生み出し分裂を非対称化する。X の候補として細胞質決定因子が考えられる。

(B) B サブユニットが欠失した場合、基質 X のリン酸化の状態が変わり、a cell のみが誕生して対称分裂 (symmetric division) になってしまう。

A



B

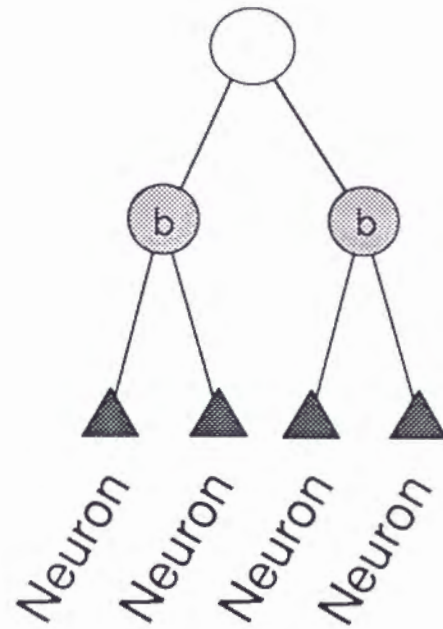
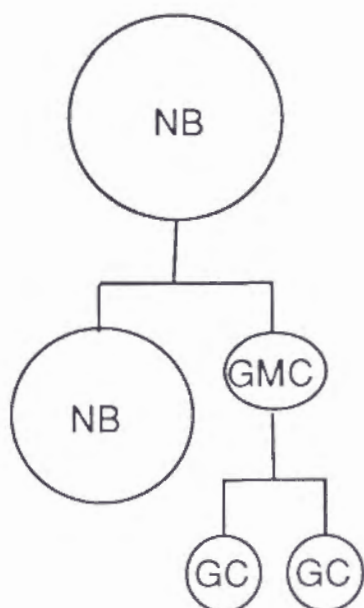


図 4-4 感覚器形成における細胞間相互作用

(A) 野生株では a cell と b cell の間や、4 つの娘細胞間で細胞間相互作用が存在する。

(B) 母細胞の分裂後に Notch を失活させると、生まれてくる娘細胞はすべて神経細胞 (Neuron) になってしまう (Hartenstein and Posakony, 1989)。

A



B

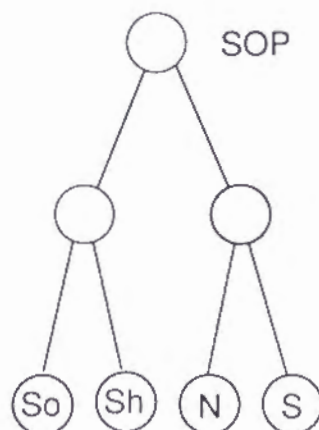


図 4-5 神経母細胞の分裂様式

(A) 神経母細胞 (NB) の分裂で ganglion mother cell (GMC) がつくられる。この分裂ではサイズが異なる娘細胞が誕生する。そして GMC の分裂で生まれた ganglion cell (GC) が神経細胞に分化する。

(B) 感覚器母細胞 (SOP) の分裂では、生まれてくる娘細胞の大きさや形に差がない。また、SOP は NB よりかなり小さい。

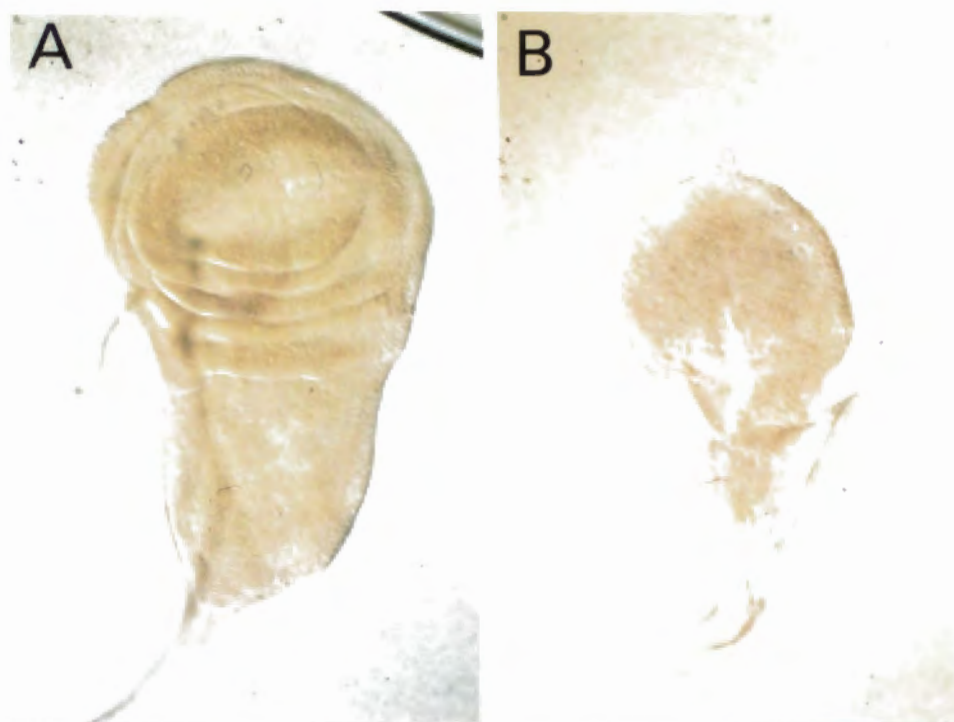


図 4-6 tws^P/Df における成虫原基の形成不全

- (A) 野生株の3齢幼虫の翅原基のホールマウント写真。
 (B) tws^P/Df の3齢幼虫の翅原基。原基の大きさが野生株に比べて明らかに小さい。

マーカー株名	染色体	<i>lacZ</i> の発現パターン	文献
ryXho38 (sca- <i>lacZ</i>)	第 2 染色体	感覚器母細胞に分化する能力のある一群の細胞	Hama et al., 1990 浜、未発表
PA49	第 2 染色体	成虫原基の前部区画と後部区画の境界部分	浜と星野、未発表
B52	第 3 染色体	感覚器母細胞とその娘細胞	Bellen et al., 1992
XA12	第 3 染色体	複眼の 7 番目の光受容細胞 (R7)	Van Vactor et al., 1991

表 5-1 解析に用いたマーカー株

解析に用いた *lacZ* マーカー株とそれらの株での *lacZ* の発現パターン。

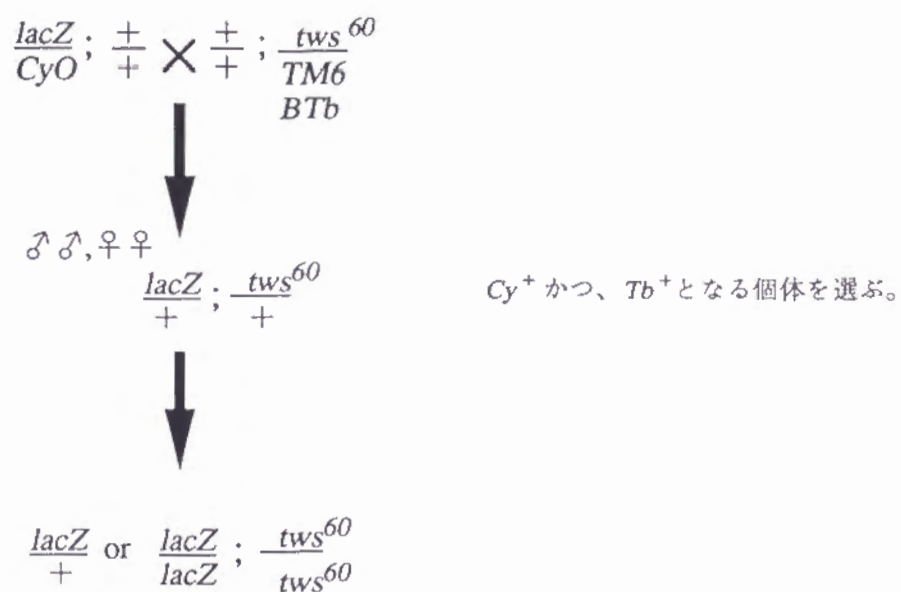


図 5-1 tws^{60} とマーカー株との交配

$lacZ$ マーカーは第 2 染色体上に、 tws^{60} 変異は第 3 染色体上にある。
 $lacZ$ マーカーが挿入された第 2 染色体を少なくとも一本持ち、かつ
 tws^{60} をホモに持つような個体での $lacZ$ の発現パターンを調べた。

参考文献

Agostinis, P., Derua, R., Sarno, S., Goris, J. and Merlevede, W. (1992). Specificity of the polycation-stimulated (type-2A) and ATP, Mg-dependent (type-1) protein phosphatases toward substrates phosphorylated by P34cdc2 kinase. *Eur. J. Biochem.* 205, 241-248.

Axton, J. M., Dombradi, V., Cohen, P. T. W. and Gloer, D. M. (1990). One of the protein phosphatase 1 isozymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell* 63, 33-46.

Banerjee, U. and Zipursky, S. L. (1990). The role of cell-cell interaction in the development of the *Drosophila* visual system. *Neuron* 4, 177-187.

Basler, K. and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-214.

Bellen, H. J., Kooyer, S., D'Evelyn, D. and Pearlman, J. (1992). The *Drosophila* couch potato protein is expressed in nuclei of peripheral neuronal precursors and shows homology to RNA-binding proteins. *Genes & Dev.* 6, 2125-36

Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E., Jan, L. and Jan, Y. N. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes & Dev.* 3, 1273-1287.

Blacketer, M. J., Koehler, C. M., Coats, S. G., Myers, A. M. and Madaule, P. (1993). Regulation of dimorphism in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the novel protein kinase homolog Elm1p and protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5567-5581.

Blochlinger, K., Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990). Patterns of expression of cut, a protein required for external sensory organ development in wild-type and cut mutant *Drosophila* embryos. *Genes & Dev.* 4, 1322-1331.

Blochlinger, K., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1993). Postembryonic patterns of expression of cut, a locus regulating sensory organ identity in *Drosophila*. *Development* 117, 441-450.

Brower, D. L. (1984). Posterior-to-anterior transformation in engrailed wing imaginal disks of *Drosophila*. *Nature* 310, 496-497.

Bryant, P. J. (1978). Pattern formation in imaginal discs. In *Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 2C. (ed. M. Ashburner and T. R. F. Wright), pp. 229-335. New York/London: Academic Press.

Bryant, S. V., French, V. and Bryant, P. J. (1981). Distal regeneration and symmetry. *Science* 212, 993-1002.

Campuzano, S. and Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet.* 8, 202-207.

Clarke, P. R., Hoffmann, I., Draetta, G. and Karsenti, E. (1993). Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell* 4, 397-411.

Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508.

Cohen, P. T. W., Brewis, N. D., Hughes, V. and Mann, D. J. (1990). Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett.* 2, 355-359.

Cooley, L., Kelley, R. and Spradling, A. (1988). Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* 239, 1121-1128.

French, V., Bryant, P. J. and Bryant, S. V. (1976). Pattern regulation in epimorphic fields. *Science* 193, 969-981.

Fryberg, E.A., Mahaffey, J.W., Bond, B.J. and Davidson, N. (1983). TRanscripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. *Cell* 33, 115-123

Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nature New Biology* 245, 251-253.

Gilbert, S.F. (1988). *Developmental Biology*. 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.

Gomes, R., Karess, R. E., Ohkura, H., Glover, D. M. and Sunkel, C. E. (1993). Abnormal anaphase resolution (aar): a locus required for progression through mitosis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 104, 583-593.

Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T. B. (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. *Genes & Dev.* 4, 1079-1093.

Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405.

Hartenstein, V. and Posakony, J. W. (1990). A dual function of the Notch gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev. Biol.* 142, 13-30.

Hatano, Y., Shima, H., Haneji, T., Miura, A. B., Sugiyama, T. and Nagao, M. (1993). Expression of PP2A B regulatory subunit β isotype in rat testis. *FEBS Lett.* 324, 71-75.

Healy, A. M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A. E., Goebel, M., Depaoli-Roach, A. A. and Pringle, J. H. (1991). CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5764-5780.

Horvitz, H. R. and Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68, 237-255.

Huang, F., Dambly-Chaudiere, C. and Ghysen, A. (1991). The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111, 1087-1095.

Ingham, P.W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.

Ingham, P.W. (1990). Pattern formation in *Drosophila*. *Seminars in Cell Biol.* 1.

James, A. and Bryant, P. J. (1981). Mutations causing pattern deficiencies and duplications in the imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 85, 39-54.

Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2700-2704.

Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1993). The peripheral nervous system. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez-Arias, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 1207-1244.

Jonas, E., Sargent, T. D. and Dawid, I. B. (1985). Epidermal keratin gene expressed in

embryos of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5413-5417.

Kamibayashi, C., Estes, R., Slaughter, C. and Mumby, M. C. (1991). Subunit interactions control protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 266, 13251-13260.

Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. (1990). Distinct, essential roles of type I and 2A protein phosphatase in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* 63, 405-415.

Kinoshita, N., Yamano, H., Niwa, H., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes & Dev.* 7, 1059-1071.

Krumlauf, R. (1994). *Hox Genes in Vertebrate Development*. *Cell* 78, 191-201.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lawrence, P. A. and Morata, G. (1976). Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene. *Dev. Biol.* 50, 321-337.

Lee, T. H., Solomon, M. J., Mumby, M. C. and Kirschner, M. W. (1991). INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell* 64, 415-423.

Mayer, R. E., Hendrix, P., Cron, P., Mathies, R., Stone, S. R., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J. and Hemmings, B. A. (1991). Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry* 30, 3589-3597.

Mayer-Jaekel, R. E., Baumgartner, S., Bilbe, G., Ohkura, H., Glover, D. M. and Hemmings, B. A. (1992). Molecular cloning and developmental expression of the catalytic and 65-kDa regulatory subunits of protein phosphatase 2A in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* 3, 287-298.

Mayer-Jaekel, R. E., Ohkura, H., Gomes, R., Sunkel, C. E., Baumgartner, S., Hemmings, B. A. and Glover, D. M. (1993). The 55kD regulatory subunit of *Drosophila* protein phosphatase 2A is required for anaphase. *Cell* 72, 621-633.

Mayer-Jaekel, R. E., Ohkura, H., Ferrigno, P., Andjelkovic, N., Shiomi, K., Uemura, T., Glover, D. M. and Hemmings, B. A. (1994). *Drosophila* mutants in the 55 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A show strongly reduced ability to dephosphorylate substrates of p34^{cdc2}. *J. Cell Sci.* 107, 2609-2616.

Mlodzik, M., Baker, N. E. and Rubin, G. M. (1990). Isolation and expression of *scabrous*, a gene regulating neurogenesis in *Drosophila*. *Genes & Dev.* 4, 1848-1861.

Morata, G. and Lawrence, P. (1977). Homeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. *Nature* 265, 211-216.

Mumby, M. C. and Walter, G. (1991). protein phosphatases and DNA tumor viruses: transformation through the back door? *Cell Regulation* 2, 589-598.

Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

O'Kane, C. J. and Gehring, W. J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9123-9127.

Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1993). Identification of a *Drosophila* homologue of α -catenin and its association with the armadillo protein. *J. Cell Biol.* 121, 1133-1140.

Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. and Takeichi, M. (1994). A *Drosophila* homolog of Cadherin associated with Armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev. Biol.* 165, 716-726.

O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R. and Rubin, G. M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factor required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78, 137-147

Orga, S., Brevis, N. D., Alphey, L., Axton, J. M., Dudai, Y. and Cohen, P. (1990). The structure of protein phosphatase 2A is as highly conserved as that of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 275, 44-48.

Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S. (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* 58, 955-968.

Peifer, M., Rauskolb, C., Williams, M., Riggelman, B. and Wieschaus, E. (1991). The segment polarity gene *armadillo* interacts with the *wingless* signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. *Development* 111, 1029-1043.

Perkins, L. A., Larsen, I. and Perrimon, N. (1992). corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. *Cell* 70, 225-236.

Peruski Jr., L. F., Wadzinski, B. E. and Johnson, G. L. (1993). Analysis of the multiplicity, structure, and function of protein serine/threonine phosphatases. *Adv. Prot. Phosphatases* 7, 9-30.

Poodry, C. A. and Schniderman, H. A. (1970). The ultrastructure of the developing leg of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 166, 1-44.

Posakony, J. W. (1994). Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 76, 415-418.

Ray, K., Hartenstein, V. and Rodrigues, V. (1993). Development of the taste bristles on the labellum of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 155, 26-37.

Reid, L. (1990). From gradients to axes, from morphogenesis to differentiation. *Cell* 63, 875-882.

Rhyu, M. S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491.

Ronne, H., Carlberg, M., Hu, G. Z. and Nehlin, J. O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effect on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4876-4884.

Rubin, G.M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* 240, 1453-1459.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Selleck, S. B. and Steller H. (1991). The influence of retinal innervation on neurogenesis in the first optic ganglion of *Drosophila*. *Neuron* 6, 83-99.

Selleck, S. B., Gonzalez, C., Glover, D. M. and White, K. (1992). Regulation of the G1-S transition in postembryonic neuronal precursors by axon ingrowth. *Nature* 355, 253-255.

Sharma, R.P., and Chopra, V.L. (1976). Effect of the *wingless* (*wg*¹) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 48, 461-465.

Spreji, T. H. (1971). Cell death during the development of the imaginal disks of *Calliphora erythrocephala*. *Neth. J. Zool.* 21(3), 221-261.

Steele, F. R., Washburn, T., Rieger, R. and O'Tousa, J. E. (1992). *Drosophila* retinal degeneration C (*rdgC*) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell* 69, 669-676.

Tabata, T. and Kornberg, T. B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.

Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1989). *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 58, 349-360.

Uemura, T., Shiomi, K., Togashi, S. and Takeichi, M. (1993). Mutation of twins encoding a regulator of protein phosphatase 2A leads to pattern duplication in *Drosophila* imaginal discs. *Genes & Dev.* 7, 429-440.

Usui, H., Imazu, M., Maeta, K., Tsukamoto, H., Azuma, K. and Takeda, M. (1988). Three distinct forms of type 2A protein phosphatase in Human erythrocyte cytosol. *J. Biol. Chem.* 263, 3752-3761.

Usui, K. and Kimura, K. (1992). Sensory mother cells are selected from among mitotically quiescent cluster of cells in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 116, 601-610.

Usui, K. and Kimura, K. (1993). Sequential emergence of the evenly spaced microchaetes on the notum of *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 203, 151-158.

Van Vactor, J., D. L., Cagan, R. L., Kramer, H. and Zipursky, S. L. (1991). Induction in the developing compound eye of *Drosophila*: multiple mechanisms restrict R7 induction to a single retinal precursor cell. *Cell* 67, 1145-1155.

Van Zyl, W., Huang, W., Sneddon, A. A., Stark, M., Camier, S., Werner, M., Marck, C., Sentenac, A. and Broach, J. R. (1992). Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4946-4959.

Whittle, J. R. S. (1990). Pattern formation in imaginal discs. *Seminars in Cell Biol.* 1, 241-252.

Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1233-1237.

Zipursky, S. L., Venkatesh, T. D., Teplow, D. B. and Benzer, S. (1984). Neuronal development in the *Drosophila* retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* 36, 15-26.

Zinn, K., McAllister, L. and Goodman, C. S. (1988). Sequence analysis and neuronal expression of fasciclin I in grasshopper and *Drosophila*. *Cell* 53, 577-587.

謝辞

ショウジョウバエを用いた研究、このような言葉にひかれて竹市研究室に入ってから5年半の間は、本当に短く思えます。その間、私を叱咤激励し辛抱強く御指導頂いた上村匡先生に、心から感謝の意を表します。常に全力で仕事に打ち込む研究者としての姿勢には、多くの学ぶべきものがありました。本当に有難うございました。竹市雅俊先生からは、発生生物学の面白さや、奥の深さなど多くのことを学ばせて頂きました。また鋭い指摘や助言をいただき、深く感謝致します。宮谷精二先生と千坂修先生からは、分子生物学一般に関していろいろと教えて頂きました。またマウスの研究を行うにあたって協力して頂き、御世話になりました。竹市研の皆さんにはいろいろと御世話になりました。感謝致します。

他にも多くの方々の協力を得て、研究が行われました。Y.N.Jan、L.Y.Jan 両博士には、P-lacW の挿入変異株のコレクションを利用することの許可や、その他多数のショウジョウバエの系統をいただきました。M.S.Rhyu 博士には、抗体をいただきました。またいろいろと研究を進める上で有益な討論をしていただきました。感謝致します。三菱化成生命研の富樫伸博士、名古屋大学の西田育巧博士、愛知ガンセンターの西義美博士には、共同研究をお願いしました。Perrimon 博士、国立精神神経センターの浜千尋博士には、lacZ マーカー株を分与していただきました。国立精神神経センターの松崎文雄博士、北海道教育大学の木村賢一博士と碓井和也博士、新技術事業団の伊藤啓博士には、技術上の助言をいただきました。三菱化成生命研の上田龍博士、九州大学の谷村禎一博士、筑波大学の岡野栄之博士には、有益な討論をしていただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

ショウジョウバエを初めて見たのは、父の研究室ででした。エサのにおいは今でも覚えています。その頃は同じショウジョウバエを用いて研究をするとは全く思っていませんでした。父が亡くなった後、私の我が儘を聞いて、研究者への道を許してくれた母と姉に感謝致します。